

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平7-507472

第1部門第2区分

(43) 公表日 平成7年(1995)8月24日

(51) Int.Cl.<sup>8</sup>

A 6 1 B 10/00

識別記号

庁内整理番号

F I

T 8825-4C

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 24 頁)

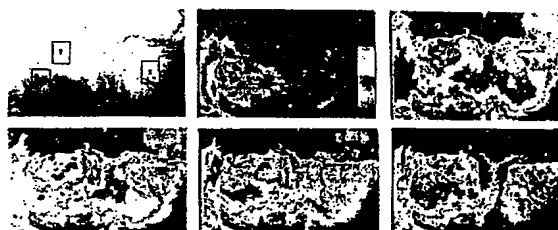
(21) 出願番号 特願平6-501728  
 (86) (22) 出願日 平成5年(1993)6月7日  
 (85) 翻訳文提出日 平成6年(1994)12月8日  
 (86) 国際出願番号 PCT/US93/05573  
 (87) 国際公開番号 WO93/25141  
 (87) 国際公開日 平成5年(1993)12月23日  
 (31) 優先権主張番号 894, 270  
 (32) 優先日 1992年6月8日  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), AU, BR, CA, CZ, H U, J P, KR, RU

(71) 出願人 ユニヴァーシティー オブ ワシントン  
 アメリカ合衆国 ワシントン州 98195  
 シアトル メイル ストップ エックスデ  
 イー-40 オフィース オブ テクノロジ  
 ー トランスファー  
 (72) 発明者 ハックマン ダリル  
 アメリカ合衆国 ワシントン州 98020  
 エドモンズ エドモンズ ウェイ 22933  
 (72) 発明者 ハグランド マイケル エム  
 アメリカ合衆国 ワシントン州 98133  
 シアトル エヌ ワンハンドレッドナイン  
 ティセブンス ブレイス 1647  
 (74) 代理人 弁理士 杉村 暁秀 (外1名)

(54) 【発明の名称】 充実性腫瘍、皮質機能および神経撮像

(57) 【要約】

本発明は注目部位に位置する充実性腫瘍組織の縁部、等級および大きさを撮像方法および装置を提供する。この方法および装置は染料により吸収される電磁放射線の波長を含む高強度の電磁放射線により注目部位を照射し、注目部位のビデオ信号を平均化制御像として得るとともにこの平均化制御像を処理して平均化制御フレームを得、注目部位に循環する血管内にボーラス注入により染料を導入し、注目部位の一連の次のフレームを次の像として時間に対して得るとともに各次の像を次のフレームとして処理し、各次のフレーム列と処理された平均化制御フレームとを比較して一連の差分像を得、且つ充実性腫瘍組織の輪郭である注目部位内の変化吸収の初期証拠として各差分像を比較して、腫瘍組織が、充実性神経組織の増大血管および染料を正常な組織が迅速にクリアし得ないことにより、染料を一層迅速に吸収し得るようになる。



より大きさを撮像する方法。

1. 注目部位に位置する充実性腫瘍組織の縁部および大きさを撮像するに当たり、
  - (a) 染料により吸収される電磁放射線の波長を含む電磁放射線により注目部位を照射し、
  - (b) 注目部位のビデオ信号をフレーム列として得るとともにこのフレーム列を処理して平均化された制御像を得、
  - (c) 注目部位に隣接する血管内にボーラス注入により染料を導入し、
  - (d) 注目部位の一連の次のフレームを時間に対して得るとともに次のフレーム列を処理して次の平均化像を得、
  - (e) 各々次のフレーム列と処理された平均化制御像とを比較して一連の差分像を得、且つ
  - (f) 充実性腫瘍組織の輪郭である注目部位内の変化した吸収の証拠として各差分像を比較して腫瘍組織が染料を一層迅速に吸収するとともに一層長く保持することを特徴とする充実性腫瘍組織の縁部および大きさを撮像する方法。
2. 前記染料を、インドシアニンググリーン、ヘマトポルフィリン、フルオレセイン、フルオレスカミン、N.P., B.P.D., エバンスブルー、およびその組合せより成る群から選択することを特徴とする請求項1に記載の充実性腫瘍組織の縁部および大きさを撮像する方法。
3. 各要素の変化速度および大きさは、
  - (a) 染料により吸収される電磁放射線の波長に対し各要素のベースライン値を決め、
  - (b) 染料を血管に注入し、
  - (c) 電磁放射線の特定の波長に対し要素値の次の列を得、
  - (d) 次の平均化像から第1平均化像フレームを差分的に合成して差分像を得、
  - (e) この差分像をアナログ像に重畳すること、
 によって比較することを特徴とする請求項1に記載の充実性腫瘍組織の縁部および大きさを撮像する方法。
4. 患者の皮膚の重要な機能部および機能不全部を光学的に撮像するに当たり、
  - (a) 高強度の電磁放射線により注目部位を照射し、
  - (b) 注目部位のビデオ信号をフレーム列として得るとともにこのフレーム列を処理して平均化された制御像を得、
  - (c) 患者のパラダイムを注入して内在信号を刺激し、
  - (d) 注目部位の一連の次のフレームを時間に対して得るとともに次のフレーム列を処理して次の平均化像を得、
  - (e) 各々次の平均化像と平均化制御像とを比較して一連の差分像を得、且つ
  - (f) 注目部位内の内在信号の証拠として各差分像を比較して内在信号が差分像の信号として表される反射特性の変化によって特徴付けられることを特徴とする充実性腫瘍組織の縁部および大きさを撮像する方法。
5. (a) アナログビデオ信号を得る手段およびこのアナログビデオ信号を処理して平均化制御像または次の平均化像を得る手段と、
  - (b) 複数の平均化像および平均化制御像を得るとともに解析して差分像を得、この差分像を処理して動きおよび雑音を計数し装置のダイナミック範囲を横切る変化を増幅する手段と、
  - (c) 差分像のみ、またはアナログビデオ像上に重畳された差分像を表示する手段とを具える装置によって内在信号を検出することを特徴とする請求項4に記載の充実性腫瘍組織の縁部および大きさを撮像する方法。
6. アナログビデオ信号を処理して平均化制御像または次の平均化像を得る手段は、
  - (a) アナログビデオ信号をデジタル化し、且つこのデジタル化信号をある完全なダイナミック範囲に亘って処理する手段と、
  - (b) 一連のフレームを平均化して平均化像を形成するとともにこの平均化像フレームからのデータを第1フレームバッファに記憶する手段と、
7. 腫瘍組織を撮像する装置は、
  - (c) 各々次の処理されたデジタル化撮像データを第2フレームバッファに記憶する手段と、
  - (d) 前記平均化制御像と前記第1および第2フレームバッファからの次の平均化像とを減算的に合成して第3フレームバッファに記憶される差分像を形成し、
  - (e) 前記差分像を処理して全ダイナミック範囲に亘り像を伸張する手段と、
  - (f) 前記差分像をカラー符号化する手段と、
  - (g) 重畳されたカラー符号化差分像を監視するモニタとを具えることを特徴とする請求項5に記載の充実性腫瘍組織の縁部および大きさを撮像する方法。
8. アナログビデオ信号を処理して平均化制御像または次の平均化像を得る手段は、
  - (a) アナログビデオ信号をデジタル化し、且つこのデジタル化信号をある完全なダイナミック範囲に亘って処理する手段と、
  - (b) 一連のフレームを平均化して平均化制御像を形成するとともにこの平均化制御像からのデータを第1フレームバッファに記憶する手段と、
  - (c) 各々次の処理されたデジタル化撮像データを第2フレームバッファに記憶する手段と、
  - (d) 前記平均化制御像と前記第1および第2フレームバッファからの次の平均化像とを減算的に合成して第3フレームバッファに記憶される差分像を形成
9. 前記比較ステップ(eおよびf)は少なくとも2つの像を差分的に合成してデジタル像を得る手段を具え、前記2つの像は幾何学的に変換することにより相互に空間的に変換することを特徴とする請求項7に記載の腫瘍組織撮像装置、または請求項5に記載の充実性腫瘍組織の縁部および大きさを撮像する方法。
10. 前記ステップ(d)および(e)は前記平均化制御像から次の平均化像を減算して第1差分像を得るとともにこの次の平均化像から前記平均化制御像を減算して第2差分像を得、且つこれら第1差分像および前記第2差分像を加算して増加したニューロン活動の領域および静止されたニューロン活動の領域を示す和の差分像を形成することを特徴とする請求項8に記載の腫瘍組織撮像装置、または請求項6に記載の充実性腫瘍組織の縁部および大きさを撮像する方法。
11. 末梢神経又は脳神経に対する損傷を撮像するに当たり、
  - (a) 損傷の疑わしき箇所およびその上流の領域を含む重要な末梢神経又は脳神経を具える注目部位を電磁放射線で照射し、
  - (b) 注目部位のビデオ信号を一連のフレームとして得るとともにこれらフレーム列を処理して平均化制御像を得、
  - (c) 損傷の疑わしき箇所の上流の箇所の末梢神経又は脳神経を刺激し、
  - (d) 刺激時にフレームの次の列を得るとともにこれらフレームの次の列を処理して次の平均化像を得、
  - (e) 次の平均化像から平均化制御像を減算して差分像を得て末梢神経又は脳神経の活性領域を撮像し、これにより、刺激された神経からの内在信号が急激

に転移するか、または差分像に変換される神経の箇所を沿う点として神経ブロックを撮像することを特徴とする末梢神経又は脳神経に対する損傷を撮像する方法。

12. 無損傷皮膚および／または骨の下側に位置する注目部位に位置する充実性腫瘍組織を撮像するに当たり、

(a) 注目部位を電磁放射線の赤外領域で照射し、  
(b) 注目部位のビデオ信号を一連のフレームとして得るとともにこれらフレーム列を処理して平均化制御画像を得、  
(c) 注目部位に循環する血管内にボラス注入により染料を導入し、この染料が前記皮膚および骨組織を経て透過し得る前記赤外スペクトルの領域の電磁放射線を吸収し、  
(d) 注目部位の一連のビデオ像を次のフレーム列として時間に対して得るとともにそれぞれ次のフレーム列を処理して次の平均化像を得、  
(e) 各々次のフレームと処理された平均化制御フレームとを比較して一連の差分像を得、且つ  
(f) 充実性腫瘍組織の輪郭である注目部位内の変化した吸収の証拠として各差分像を比較して腫瘍組織が染料を一層迅速に吸収するとともに一層長く保持することを特徴とする注目部位に位置する充実性腫瘍組織の撮像方法。

13. 各要素の吸収率変化は、

(a) 染料により吸収される電磁放射線の波長に対し各要素のベースライン値を決め、  
(b) 染料を血管に注入し、  
(c) 電磁放射線の特定の波長に対し要素値の次の列を得、  
(d) 次の像から第1平均像フレームを差分的に合成して差分像を得、  
(e) この差分像をアナログ像に重量すること、  
によって比較することを特徴とする請求項12に記載の注目部位に位置する充実性腫瘍組織の撮像方法。

## 明 細 書

### 充実性腫瘍、皮膚機能および神経撮像

#### 発明の技術分野

本発明は充実性腫瘍組織の長時間検出方法並びに腫瘍組織を等級化し、且つ特徴付ける方法に関するものである。

また、本発明は機能および機能不全大脳皮質および神経組織を長時間マッピングする方法に関するものである。

さらに本発明はかかる方法に対し長時間検出および光学的撮像を行う装置に関するものである。

#### 発明の背景

神経外科の第1の目標は正常な領域を温存しながら異常な病理組織を完全に除去することである。従って神経外科医は病理組織または機能不全組織の境界を識別し、言語、運動、知覚、知覚のような重要な機能をつかさどる皮質の隣接領域をマッピングすることを試みて、病理／機能不全組織を機能領域を除去することなく摘出するようにしている。

原発性の頭蓋内腫瘍の有病出現率は人口100万当たり50～150、または年間約18000である(Berens等、1990年)。この腫瘍のほぼ1/2は悪性である。成人の悪性脳腫瘍の出現率は40～55歳台が圧倒的であり、一層悪性な腫瘍の出現は35歳近辺がピークである。かかる腫瘍を処置する主な手段は外科的に除去することである。多くの研究によれば全腫瘍組織の大部分を除去する場合には臨床転帰(結果)が良好となる。腫瘍を全摘出する場合には5年生存率は腫瘍の部分的摘出に比べて2倍となる。患者の生存状態および後遺状態の両期間は、摘出の程度が悪性の神経腫瘍で最大となる際に長くなる。現在の手術時の技術は、特に一旦腫瘍の摘出が開始されると、正常な脳組織から腫瘍組織を迅速に識別することはできない。腫瘍組織を手術時に識別し得る可能性を増大する技術を開発することによって組織摘出の程度を最大にして生存を長引かせることができる。

米国では年間全身癌で死に至る500,000人のうちのほぼ25%、即ち、125,000

14. 無損傷皮膚および／または骨の下側に位置するCNS内の重要な機能領域または機能不全領域を撮像するに当たり、

(a) 電磁放射線の赤外領域により注目部位を照射し、  
(b) 注目部位のビデオ信号をフレーム列として得るとともにこのフレーム列を処理して平均化された制御画像を得、  
(c) 患者にパラダイムを注入して内在信号を刺激し、  
(d) 注目部位の一連のビデオ像を次のフレーム列として時間に対して得るとともにそれぞれ次のフレーム列を処理して次の平均化像を得、  
(e) 各々次のフレーム列と処理された平均化制御フレームとを比較して一連の差分像を得、且つ(f) 充実性腫瘍組織の輪郭である注目部位内の変化した吸収の証拠として各差分像を比較して腫瘍組織が染料を一層迅速に吸収するとともに一層長く保持することを特徴とする重要な機能領域または機能不全領域の撮像方法。

15. 各要素の吸収率変化は、

(a) 染料により吸収される電磁放射線の波長に対し各要素のベースライン値を決め、(b) 染料を血管に注入し、  
(c) 電磁放射線の特定の波長に対し要素値の次の列を得、  
(d) 次の像から第1平均像フレームを差分的に合成して差分像を得、  
(e) この差分像をアナログ像に重量すること、  
によって比較することを特徴とする請求項14に記載の注目部位に位置する充実性腫瘍組織の撮像方法。

人以上は頭蓋内転移であると思われる。このグループにおける外科の初期病巣は広域または進行性癌を有していない単一病巣のこれら患者に存在する。しかし、このグループは転移患者のほぼ20～25% (30,000人)であり、外科手術で良好となる患者の実際の数は極めて僅かである。外科手術を行うこれら患者の半分は手術箇所におけるこれら腫瘍の局部再発であり、残りの半分は他の箇所を発生するものである。外科手術のほぼ50%が手術箇所で失敗すると言う事実は腫瘍除去中腫瘍の輪郭検出し、局限することによってできるだけ充分に腫瘍を除去する可能性が局所再発の発生率を確実に減少することを意味する。

これがため、原発性腫瘍および転移腫瘍の双方に対し、多くの腫瘍組織を抽出し、臨床転帰(結果)が良好となり、生存が長くなる。さらに、切除の程度を最大とすることによって機能的に良好な品質の生存の長さが増大する。

最も最近の腫瘍撮像技術は腫瘍の位置に関する情報を外科手術前に得るようにしている。この外科手術前の撮像方法は磁気共鳴映像法(MRI)およびコンピュータ断層撮影法(CT)を含む。手術室内では、手術時超音波および定位システムのみによって腫瘍の位置に関する情報を得ることができる。超音波システムによって体表面から腫瘍の位置を知ることができるが、一旦手術が開始されると、腫瘍組織を最大に除去しながら、重要な機能組織が破壊されるのを防止する情報を外科医に提供することはできない。進歩した撮像技術と結合する定位システムは(選ばれた数値所の病院では)手術前CTまたはMRI走査に基づき腫瘍境界を局限し得るようにしている。しかし、撮像増大された推定の腫瘍が手術前の像に位置する箇所を越えて2～3cmに亘り実際の腫瘍が延在することは研究(Kelly, 1990年)により示されている。従って、腫瘍の位置を決める現在信頼性のある方法は外科手術中生検に送り(即ち、多重組織検体サンプリングを行い)且つ凍結切片の顕微鏡結果を待つことである。この場合には外科手術中ブレークを連続的にとることを望まず、かかる生検が最も良くて推測技術であり、サンプリング誤差を受け、およびほぼ一週間後に得られる永久の組織区分に比べ正しくない読取りを行うようになる。これがため外科医は患者の臨床転帰が腫瘍組織の積極的な除去に依存する限りの質内として推測技術にしばしば依存するようになる。外科医は積極的に除去する組織と破壊する周囲の機能組織との境界を決めるのが困難

であり、1週間後までこの処理の実際の臨床転帰を知ることができず、これは対外的な外科手術を必要とする。

多重組織線サンプリングも幾つかの欠点を有する。第1に、患者が麻酔状態にある際の外科的措置に対し（取出したサンプルに依存して）ほぼ30～90分を追加することができるため、時間の掛かる措置である。第2に、削換者が短時間にサンプルを用意し評価するため、この措置に誤りが生じやすい。第3に、境界線サンプルが原発性腫瘍を囲む全ての領域を確実に評価しない場合がある。その理由は残存腫瘍のある区域がサンプリング誤差のため、ミスとなり得るからである。第4に、境界線サンプリングにかかる時間が増大すると、高価となる。その理由は手術室の時間コストが高くなり、ひいては金医療コストが増大するようになる。さらに、患者に対する手術室の時間が増大すると感染の可能性が増大する。

外科的手術中充実性腫瘍マスの可視像を改善する他の技術は正常組織行う悪性組織から可視ルミネッセンススペクトルの形状を決めることである。米国特許第4,930,516号によれば、癌性組織では、正常な組織と比較して種々の異なるルミネッセンス強度のピークで青色に変色する。この方法によれば紫外（UV）光のビームで組織を励起するとともに組織から放出された可視自然ルミネッセンスと同一の組織型からの歴史的制御とを比較する。掛かる措置は困難性を伴う。その理由は腫瘍腫瘍の長時間空間マップを外科医の使用に供せないからである。さらに、励起波長に対し紫外光を用いることによって、正常なセルに対し光学的変化を生ぜしめ得るようになり、手術室で使用するものは危険であり、組織に残り浸透し、ガラスの代わりに石英光学的素子が必要とする。

これがため、一層広範囲且つ迅速な技術が必要とし、しかもかかる技術を補助して充実性腫瘍の箇所を限定するとともに外科手術中実時間モードで正確な腫瘍境界をマッピングする装置を必要とする。かかる方法および装置は非腫瘍的処置による任意の充実性腫瘍の高価な評価（例えば乳房造影法）に対しさらに有効であり、腫瘍を等級化し、特徴付けることができる。

また、神経外科処置中脳の機能を確保する必要もある。例えば、これらの原理を例示する一種の脳外科処置は難治性てんかん（即ち、投薬により制御し得ないてんかん）の外科的処置である。現在、脳波検査（EEG）技術および皮質脳波

検査（ECOG）技術を外科手術前および中に用いて、てんかん病巣のような異常脳活動の区域を識別するようにしている。これらの手段によって脳の電気的な活動を直接測定するようにしている。

手術中のEEG技術には皮質の表面に電極アレイを設けることも含まれる。これはてんかん発作の発生の異常な皮質活動を限定するために試みられた。EEG技術が広く用いられるようになってからも危険および制限がこれら技術に関連するようになる。電極表面の大きさおよびEEG技術における電極間の距離はてんかん病巣を有する脳セル（例えばニューロン）の大きさに対して大きくなる。これがため、現在の技術によって異常な皮質活動の区域の空間解像度（ほぼ1.0cm）が乏しくなる。更にEEG技術によっては（患者がスピークする際電気的活動を記録することによって言語機能、運動機能および知覚機能に専念する皮質領域を識別し得るような）外部刺激に反応して正常な皮質機能のマップを提供しない。皮質誘発電位と称されるこの技術の変形によってある機能的マッピングを提供することが可能である。しかし、この皮質誘発電位技術にはEEG技術と同様の解像度の問題がある。

てんかんおよび腫瘍外科手術における皮質機能の手術中極限の最も普通の方法は刺激電極によって皮質表面を直接電気的に刺激することである。この技術を用いることにより外科医は身体の特定の部分から観察された運動応答を誘発するかまたは覚醒した患者の場合には特定の感覚を発生させるか、または患者の音声出力に中断を生ぜしめることを試みる。さらにこの技術によればEEG技術と同様の問題が生じる。その理由はこれにより機能の粗い空間的極限のみを行うからである。

これら技術全部の不正確さの可能な結果は、患者の難治性てんかんに対し応答可能な皮質の部分を選択するために用いる際、皮質組織の必要以上の量が確実に除去されて機能欠陥患者ができるか、または組織が十分に除去されないで外科手術により治癒しない患者ができるようになる。これらの不適切にもかかわらず、かかる技術は難治性てんかんに対する許容し得る処理であると思われている。しかし、同様の原理を腫瘍の外科手術に適用しても手術中の機能マッピングを日常的に行う訳にはいかない。

たはニューロンおよび/または神経膠細胞の腫瘍からの光の増大した散乱を含む。

これがため、従来は、正常および異常皮質組織を精密且つ迅速に識別し得る皮質組織を実時間光学的に画像化する装置および装置を必要とする。また、従来は、高い空間的解像度で内在信号を撮像し得るとともに直ちに像を提供し、且つ手術室における通常の処置と両立し得る方法を必要とする。

本発明は部分的にかかる必要性を満足せんとするものである。

#### 発明の要旨

本発明方法および装置は、染料の組織を通る灌流のダイナミクスを反映する電磁吸収の変化を撮像することにより充実性腫瘍を識別し、等級付けし、特徴付けるために用いることができ、この原本発明装置は染料灌流中光学信号のダイナミック変化を有する周囲の正常な組織から腫瘍組織を識別することができる。さらに、本発明方法および装置は神経外科処置中ニューロン活動を識別するために用いることができる。特に、この発明は視覚、運動、感覚、記憶および言語のような重要な機能をつかさどる脳領域を識別するために手術中の神経外科医が用いることができる。さらに、本発明方法および装置を用いて、てんかん病巣のような異常な皮質活動領域を検出することができる。最後に、本発明を用いて腫瘍除去または重度神経吻合に対する神経外科処置中個別の神経を識別することができる。

本発明はアナログビデオ信号列を得る手段、このアナログビデオ信号を処理して平均化制御像又は次の平均化像を得る手段、複数の次の像および平均化制御像を得るとともに解析して差分像を得、この差分像を処理して動きおよび速度を計数し装置のダイナミック範囲を横切る変化を増幅する手段、および差分像のみ、またはアナログビデオ像上に重畳された差分像を表示する手段を具えることにより、腫瘍組織を撮像する装置、または皮質内在信号を実時間外科手術時に撮像し、または染料の灌流中光学信号のダイナミック変化から充実性腫瘍組織の輪郭を可視化する装置を提供する。

さらに本発明によれば、染料により吸収される電磁放射線（例えば光）の波長を含む特に強力な変動のない電磁放射線により注目部位を照射し、注目部位のビデオ信号をフレーム列として得るとともにこのフレーム列を処理して平均化制御像を得、注目部位に循環する血管内にボラス注入により染料を導入し、注目部

過去数年来、研究者は動物モデルにかかる撮像技術を用いて高い空間的解像度で皮質の機能領域を撮像するようにしている。かかる技術の1つの型のもは電圧-感応染料を用いる。この電圧-感応染料はニューロンの電気的活動の変化中にその光学特性が変化する染料である。これら技術によって達成される空間解像度は単一セルレベルに近い。ブラズデル（Blasdel）およびサラマ（Salama）（ネイチュア321:579, 1986年）は電圧-感応染料を用いて脳のモデルで皮質機能をマップした。この種の染料を使用するとその毒性のため人類に使用するには危険が大きすぎる。さらに、かかる染料は光により漂白されるとともにしばしば注入することができる。

最近、電圧-感応染料撮像と同様の空間解像度を提供する内在信号の測定が示されるようになった。これら内在信号はニューロン活動の変化によって部分的に生じる皮質の組織変化を反映する光である。ニューロン活動を撮像するため、即ち、内在信号を撮像するために用いる同様の他の技術は（臨床的使用に対しては中郡になり過ぎる）染料またはラジオアクチブラベルを用いることを必要としない。例えば、グリンバルト（Griensvald）等（ネイチュア324:361, 1986年）は電気または代謝活動に反応して組織の反射率によって皮質組織の光学特性の真性変化を測定する。また、波長500～700nmの光は高いニューロン活動の領域に流れる増大した血液のため、活性組織および不活性組織間で異なって反射する。内在信号に寄与する他の要因はオキシヘモグロビンとデオキシヘモグロビンとの比の変化である。

ツノ（Ts'o）等（サイエンス249:417, 1980）は電荷結合装置（CCD）カメラを用いて脳のモデルで内在信号を検出するようにしている。しかし、この技術は臨床的環境において実用的でない。その理由は頭蓋内にストレスフィールドの光学室を建設することにより撮像が行われており、且つ充分な信号対雑音比を得るために、ツノ（Ts'o）等は像当たり30分以上の時間周期に亘って像を平均化している。皮質機能を極限化する他の既知の技術全部と比較することにより内在信号の撮像は相対的に非侵入技術である。

内在信号に反応し得る機構は十分に理解されていないが、内在信号の可能なソースは小血管の拡張、即ち、カリウムのニューロン活動に依存する解離から、ま

位の一連の次のフレームを時間に対して得るとともに次のフレーム列を処理して次の平均化像を得、各々次の平均化像と平均化制御像とを比較して一連の差分像を得、且つ充実性腫瘍組織の輪郭である注目部位内の変化した光学信号の初期証拠として各差分像を比較して、腫瘍組織が正常な組織と比較された染料摂取の種々の異なる運動エネルギーと充実性腫瘍組織の増大した血管分布の結果として光の異なる吸収の一種的な変化パターンによって特徴付けられるようにして、注目部位に位置する充実性腫瘍組織の腫瘍輪郭および大きさを検出する方法を提供する。適切な染料としては

インドシアニン、フルオレセイン、ヘマトポフィリンおよびフルオレスカミンがある。好適な染料はインドシアニングリーンであり、これは広い吸収波長範囲および730 nm～840 nmの範囲のピーク吸収を有する。

さらに本発明によれば、患者の皮膚の重要な機能領域を光学的に検出するに当たり、電磁放射線の近赤外波長を含む高強度の電磁放射線により注目部位を照射し、注目部位のフレーム列を得るとともにこのフレーム列を処理して平均化された制御像を得、患者に刺激性パラダイムを注入して内在信号を刺激し、注目部位の一連の次のフレームを時間に対して得るとともに次のフレーム列を処理して次の平均化像を得、各々次の平均化像と平均化制御像とを比較して一連の差分像を得、且つ

注目部位内の内在信号の初期証拠として各差分像を比較して内在信号が差分像の信号として表される電磁放射線反射特性の変化によって特徴付けられる患者の皮膚の重要な機能領域の光学検出方法を提供する。

さらに本発明によれば、末梢神経又は脳神経に対する損傷を検出するに当たり、(a) 損傷の疑わしき箇所およびこれに隣接する領域を含む重要な末梢神経を具える注目部位を高強度の電磁放射線で照射し、(b) 注目部位の一連のフレームを得るとともにこれらフレーム列を処理して平均化制御像を得、(c) 損傷の疑わしき箇所に隣接する箇所の末梢神経又は脳神経を刺激し、(d) 刺激時にフレームの次の列を得るとともにこれらフレームの次の列を処理して次の平均化像を得、(e) 次の平均化像から平均化制御像を減算して差分像を得て末梢神経又は脳神経の活性領域を可視化し、これにより、刺激された神経からの内在信号が

れ形成し、(g) 第2の差分像に対する第1の差分像の比をとることにより増強された差分像を得るようにする。注目部位を照射する単色電磁放射線源はレーザ光源とするのが好適である。この技術を用いて注目部位の3次元情報を得ることができる。

#### 図面の簡単な説明

図1は1つの記録(r)と、2つの刺激電極(s)と、変化度が決まる3つの箇所(#1, #2, #3)とを有する前面運動皮膚の直前の人の皮膚を示す。スケールバーは1 cmである。128個の像(4/秒)の平均は30 Hzで得られ、且つ記憶される(1/秒)。3～5個の平均化制御像(5秒/像)を得た後、双極皮膚刺激によって発生後のてんかん活動を誘発した。

図1Aは1つの記録(r)と、2つの刺激電極(s)と、これら領域全体に亘る吸収の変化度が決まる4つの箇所(4角枠で囲んだ領域1, 2, 3および4)とを有する前面運動皮膚の直前の人の皮膚を示す。皮膚は電磁放射線>690 nmで照射した。スケールバーは1 cmである。

図1Bは図1Aに示す4角枠1および3の空間領域における電磁放射線吸収の変化度(毎秒)をプロットして示す。両領域に対し、ピーク変化は最大量の刺激電流が誘発された4つの刺激試行(8 mA)中最も長いてんかん発生後の活動である。4角枠3内の変化度は4角枠1内の変化度よりも大きく且つ一層長かった。4角枠3はてんかん発作領域(患者のてんかんに対し応答可能な組織の活動可能な領域)上に位置していた。

図1Cは図1Aに示す4角枠1および4の空間領域における電磁放射線吸収の変化度(毎秒)をプロットして示す。4角枠1は2つの刺激電極間の皮膚組織の領域上に位置し、4角枠4は血管上に位置する。4角枠4内の変化度は4角枠1よりも充分大きく、その反対方向にある。また、これらの変化度は刺激電流およびてんかん発生後の活動の大きさによって等級化される。4角枠4内の変化度は血管内の血流速度の変化に著しく依存するため、このプロットは本発明が皮膚活動および血流を同時にモニタし得ることを示す。

図1Dは図1Aに示す4角枠1および2の空間領域における電磁放射線吸収の変化度(毎秒)をプロットして示す。これら2つの領域が互いに近接しているに

急激に終端するか、または差分像に変換され、減算されるかまたは減少される神経の箇所に沿う点として神経ブロックを可視化するようにした末梢神経又は脳神経に対する損傷を検出する方法を提供する。

また、本発明によれば、神経組織を囲む、即ち、これに隣接する腫瘍組織を像として神経組織を破壊することなく腫瘍組織を選択的に検出するに当たり、(a) 染料によって吸収された電磁放射線の波長を含む高強度の電磁放射線によって注目部位を照射し、(b) 注目部位の一連のフレームを得るとともにこれらフレーム列を処理して平均化制御像を得、(c) 神経を刺激し、(d) 一連の次の神経フレームを得てこれら次の神経フレーム列を処理して神経の次の平均化像を得、(e) 神経の次の平均化像から神経の平均化制御像を減算して神経の差分像を得て活性神経を可視化し、(f) 注目部位に給血する動脈に染料を導入し、(g) 一連の腫瘍の次のフレームを得るとともにこの一連の腫瘍の次のフレームを処理して腫瘍の次の平均化像を得、(h) 腫瘍の次の平均化像から腫瘍平均化制御像を減算することにより腫瘍の差分像を得て腫瘍を可視化し得る腫瘍の差分像を形成するようにした腫瘍組織検出方法を提供する。さらに腫瘍の差分像および神経の差分像を互いに重畳して腫瘍組織および神経組織の相対位置を同時に可視化することができる。

また、本発明によれば、腫瘍組織から得た像または内在信号差分像の感度およびコントラストを増強するに当たり、(a) 少なくとも電磁放射線の第1波長および第2波長を含む放射線の複数の波長により注目部位を照射し、(b) 電磁放射線の第1波長から得た第1フレーム列および電磁放射線の第2波長から得た第2フレーム列等を含む電磁放射線の各波長に相当するフレーム列を得、(c) 第1フレーム列、第2フレーム列等を処理して第1平均化制御像、第2平均化制御像等を形成し、(d) 内在信号を刺激するかまたは腫瘍組織像に対する染料を導入し、(e) 電磁放射線の第1波長を用いる第1列の次のフレーム、電磁放射線の第2波長を用いる第2列の次のフレーム、等を得るとともに第1、第2等の次のフレーム列を処理して第1、第2等の次の平均化像をそれぞれ形成し、(f) 第1の次の平均化像、第2の次の平均化像、等から第1の平均化制御像、第2の平均化制御像、等をそれぞれ減算して第1の差分像、第2の差分像、等をそれぞ

もかわらず、これらの光学的変化は8 mAの電流を用いる最初の3つの刺激試行中反対方向にある。4角枠2の領域内の負に向かう変化は本発明を用いて皮膚活動および筋収縮の禁止をモニタすることができることを示す。

図2は刺激誘起てんかん活動の空間マップを示す。この図2には皮膚活動の程度で等級化された光学変化の空間程度および振幅の両方に対する種々の異なる活性度間の比較を示す。特に、図2は図1に示す刺激試行(刺激試行の定義は図1の記載で示す)のうちの2つの刺激試行中の種々の回数からの差分像度を示す。上側の3つの画像(A2, B2およびC2)は、8 mAの電流による皮膚刺激が誘発された刺激試行2からてんかん後発生の主期間である。これら画像を刺激試行4から8 mAで皮膚刺激によって誘発された光学変化を示す下側の画像と比較する。図2、A2およびA4は休息中の制御像と比較する。図2、B2およびB4はてんかん後発生活動中に発生するピーク光学変化と比較する。図2、C2およびC4はピーク光学変化が観察された後20秒で回復する程度を比較する。光学変化の大きさは図の中央のグレイスケールバーによって示す。グレイスケール近くの矢印は振幅が増大する方向を示す。各像はほぼ4 cm×4 cmの皮膚の領域を示す。

図3は活性領域およびてんかん発作領域を識別する光学信号の一連のダイナミック変化を示す。図3には前の2つの図に示される刺激試行2からの8つの差分像度を示す。各像は2秒間隔で積分される。最大の光学変化の病巣領域は、像3、4および5の中心において、最大の皮膚活動の領域を示す。この領域画像てんかん病巣である。光学変化の大きさは図の右側にグレイスケールバーで示す。グレイスケール近くの矢印は振幅が増大する方向を示す。各像はほぼ4 cm×4 cmの皮膚の領域を示す。

図4は人の皮膚における刺激誘発光学変化のダイナミック変化の長時間シーケンスを示す。図4のパネル1～8は各々が8フレーム(<1/4秒/像)の平均値である8つの連続する差分像度を示す。光学変化の大きさは図の中央にグレイスケールバーで示す。グレイスケール近くの矢印は振幅が増大する方向を示す。各像はほぼ4 cm×4 cmの皮膚の領域を示す。この図は、本発明装置および方法を用いて光学変化のダイナミクスを長時間でマップするとともに情報量

の多いフォーマットでかかる情報を外科医に知らせることができる。

図5は麻酔をかけられた鼠の末梢神経の刺激による体性感覚皮質の活性(鼠の後肢の座骨神経を直接刺激することによる導入知覚入力)を示す。最左側の像は麻酔をかけられた鼠の後肢体性感覚のグレイスケール像である。倍率を充分高くして個別の毛細血管が識別され得るようになる(この像には最小の血管が見える)。中央の像は休息中の差分度差制御光学像の像である。光学変化の大きさはこの像の中央にグレイスケールバーで示す。グレイスケール近くの矢印は振幅が増大する方向を示す。最右側の像は座骨神経の刺激中、後肢体性感覚皮質の光学変化の差分度マップである。

図6は人の言語領域(Broca's area)並びに寛解した患者の舌感覚および口蓋感覚領域の機能的マッピングを示す。3つの「舌運動」試行中像は平均化され(32フレーム、1秒)、2秒毎に記録される。舌運動試行は、休息中5つ〜6つを得るとともに患者が口の上蓋に対し舌を運動し、次いで回復期間中像を得続ける必要があることを40秒間示す像を得ることにある。同一の患者は「言語ネーミング」試行でも同様のことを行う。言語ネーミング試行は休息中の5つ〜8つの像(制御像一患者は一連の空白スライドを沈黙して見る)を得、次いで(Broca's area)領域で大きな応答を誘発するように選択された2秒毎のスライドプロジェクトにより存在する一連の物体をネーミングする)ネーミングパラダイムで患者が同様のことを行う時間周期中の像を得るとともに最終的に(再び沈黙しながら空白のスライドを見る)ネーミングタスクを患者がやめる際の時間(回復期間中一連の像を得ることである。像A1およびB1は人の皮質の領域のグレイスケール像であり、左側は前部、右側は後部、上側は頂部、下側は底部外側である。像A1、B1、A2およびB2の2つの墨印はこれら像間の基準点である。像A1およびB1の下側右隅のスケールバーは1cmとする。像A1において、番号を付した4角枠は電気刺激電極による皮質刺激によって口蓋運動(1)、舌運動(2)、舌停止-Broca's area(3、4)および無応答(11、12、17、5-前運動)を誘発する箇所を示す。像A2は1つの舌運動試行の休息中の皮質の差分度差制御像である。像A2の右側のグレイスケールバーは像A2、A3、B2およびB3に関連するカラーコードの相対的な大きさを示す。像A3は1つ

の舌運動試行中に発生するピーク光学変化の差分度マップである。皮質刺激により舌および口蓋感覚領域として識別された領域は大きな正の変化を示す。周囲領域においてベースライン値を抑制することは1つの舌運動試行中言語運動領域が負に向かう光学信号を示すことを表す。像B2は1つの言語ネーミング試行中の皮質の差分度差制御像である。像B3は言語ネーミングタスク中の皮質のピーク光学変化の差分度像である。大きな正に向かう信号はBroca's area領域に存在する。負に向かう信号は舌および口蓋感覚領域に存在する。

図7は舌および口蓋感覚領域およびBroca's area領域で誘発された人の皮質のダイナミック光学変化の時間コースおよび大きさをプロットして示す。この図7には、3つの舌運動試行の各々および1つの言語ネーミング試行中図6に示す4角枠で囲まれた領域、即ち、像A1およびB1ないの組織の光吸収の変化度をプロットして示す。図7Aは3つの舌運動試行中図6で示される4角枠1、2、3および4内で空間的に平均化された像A1をプロットして示す。図7Bは4角枠1〜7および17内で空間的に平均化された言語ネーミング試行の1つを示す。

図8は寛解した人の言語理解(Wernicke's area)に重要な皮質領域の光学マップを示す。図8の像Aは患者の皮質表面を示し、その解剖学的指向は左側が前部、下側が下部、上側に沿って外側溝が走っている。光学像像後太いラインの左側の皮質組織全部は外科手術的に残存している。箇所#1および#2は音声に対する本質的なもの(例えば、ネーム物体に対する被体の皮質刺激のブロックされた可能性)として識別される。箇所#3では3つの刺激試行における1つのネーミング誤差を見いだした。外科手術的抽出が太いラインの墨印でラベルされた領域に到達すると、患者の言語は劣化する。図Aのラベルを付していない箇所全部は誤りはないが皮質刺激中スライドをネーミングする。図8の像Bは言語ネーミング試行中に得られた皮質のグレイスケール像の差分度像のオーバーレイを示す(言語ネーミング試行を説明している図6参照)。光学変化の大きさはこの像の右側にグレイスケールバーで示す。この像は外科医がこの発明を手術に用いて言語皮質をマップする手段を示す。

図9はWernicke's area(言語理解)で誘発された人の皮質のダイナミック光学変化の時間コースおよび大きさを示す。図9Aには図8に示す4角枠で囲まれ

た領域内の組織の光吸収の変化度をプロットして示す。4角枠1および2のプロットは本質的な言語箇所上に位置し、4角枠4、5および6は第2言語箇所上に位置する。これら5つの箇所の各々の表示は患者が言語ネーミングタスクを行っている間に発生した著しい変化を示す。図9Bは図8に示す6つの番号を付していない4角枠からの変化度を示す。これら前部箇所内では充分な増減はない。

図10は低い等級の人のCNS腫瘍を識別する染料の差分ダイナミクスを示す。この像列は低い等級のCNS腫瘍(星状細胞腫、等級I)を有する患者から得たものである。図10A(上部左側)において、外科医により脳上に置かれた文字ラベルは超音波によって手術中に確認された腫瘍上に位置している。しかし、この腫瘍および等級の腫瘍は一旦腫瘍の外科的除去が開始されると正常な組織から識別するのが極めて困難である。図10B(中央左側)には染料(インドシアニンググリーン、1mg/kg)の静脈注入後15秒経過した差分像を示す。図10C(下部左側)には、染料導入後30秒経過した差分像を示す。腫瘍組織の領域は第1の組織染色を示す。図10D(上部右側)には、この低い等級の腫瘍において、全ての組織(正常な組織および異常な組織の双方)が染料導入後45秒で染色されることを示す。図10E(中央右側)は染料導入後1分経過した場合には示し、図10F(下部右側)は染料導入後5分経過した場合には示す(この低い等級の腫瘍では完全なクリアランスを示す)。これらのデータは、インドシアニンググリーンが正常な組織よりも迅速に低い等級の腫瘍に導入され、且つ正常な組織よりも良性的腫瘍組織からクリアランスするのに時間がかかり、従って低い等級の腫瘍でも撮像でき、従って、周囲の正常な組織から低い等級の腫瘍組織を手術中に識別することができる。

図11は染料の差分ダイナミクスによって悪性の人CNS腫瘍を識別する場合を示す。図11の一連の像は悪性のCNS腫瘍(膠芽細胞腫、星状細胞腫、等級IV)を有する患者の皮質から得たものである。図11A(上部左側)はグレイスケール像を示し、この際、悪性の脳腫瘍組織は中央および右側に著しく密集し、その他の箇所は(外科的手術後)適度に得られる病変スライドおよび血流血球計算によって示されたように大部分正常な組織であった。図11B(中央左側)はインドシアニンググリーンの静脈注入後15秒経過した差分像であり、悪性の組織にお

ける最初の数秒の染料潮流のダイナミクスを示すことは良性的腫瘍組織の最初の染料の染料潮流のダイナミクスと同様である(図11C参照)。図11C(下部左側)は30秒経過後の悪性の腫瘍が正常な組織と比較しても一層著しいことを示す。図11D(上部右側、染料注入後1分)および図11E(下部右側、染料注入後10分)は良性的腫瘍組織と同様に、悪性の腫瘍組織において、染料を充分長期間に保持し、ある場合には長時間周期に亘って悪性の腫瘍組織に滞留し続けることを示す。これらのデータは悪性の腫瘍組織を確認し、正常な組織および良性的腫瘍組織を手術中に識別し、且つ腫瘍の種々の等級(例えば、正常対良性対悪性)を識別し得るようになることを示す。

図12は染料の差分ダイナミクスが抽出された悪性の人CNS腫瘍の輪郭部における腫瘍組織の僅かな残遺物を確認する場合を示す。これらの像は、腫瘍が外科手術的に抽出され、試験切除が多重組織輪郭サンプリングに対して与えられた注目部位から得たものである。注目部位は腫瘍の外科手術的除去後腫瘍組織が存在しなかった。通常は、この大きさの抽出線面においては、単一の冷凍サンプルを顕微鏡解用採取する。研究の目的で、本発明により得られたマップによって組織を相関するために前記線部から5つの試験切除を行う。図12A(上部左側)は腫瘍線部のグレイスケール像を示す。図12B(上部右側)は外科医が脳に直接配置したラベルを有する線部を示す。これらラベルの目的は、外科医が差分像が本発明後置により得られた後組織解解用の試験切除サンプルを除去しようとすることを確認するためのものである。図12C(下部左側)は染料の静脈注入後1分経過した差分像を示し、図12D(下部右側)は染料注入後10分経過した差分像を示す。これら染料注入後の差分像は腫瘍組織および正常な組織の領域を含む多数の判断箇所を示す。光学像の精度は試験切除の解析によって手術後に確認される。図12Dの下部右側の僅かな領域は外科医によって試験切除されていらない腫瘍組織の可能な領域を示す。従って、広範囲な試験切除の場合でも、サンプリング誤りは本発明の精度以上となる。これらのデータは腫瘍抽出後の腫瘍線部に腫瘍の僅かな残遺物が確認され得ることを示す。

図13はMRI画像によるコントラストが増強されない患者の腫瘍を確認し且つ特徴づけることができる場合を示す。良性的でない腫瘍の構造は現在のMRI撮

像技術では観察されない。この図13の像は腫瘍のコントラストがMRIによって増強されない患者から得られたものである。かようにコントラスト増強ができないのは通常典型的な良性的腫瘍に対してである。しかし、光学的な撮像はこの腫瘍を良性的でない型(病型および血流の血球計算によって1週間後に示される肛門型星状細胞腫)として確認することができる。図13Aは注目部位のグレースケール像を示す。図13Bは染料注入前の差分像を示す。図13Cは静脈内染料注入後1分経過した注目部位を示す。図13Dは染料注入後5分経過した重要な注目領域を示す。この場合染料はこの組織に十分な時間に亘って保持される。図10、11および12に示すように、このダイナミックな特性は良性的でない腫瘍の特徴である。

図14は無損傷頭蓋に基く神経腫瘍の染料によるダイナミクスおよび確認の非腫瘍像を示す。この図14は本発明を用いて無損傷頭蓋による腫瘍を確認し得ることを示す。図14Aは鼠の頭蓋表面のグレースケール像である。縫結合は像の中央を走っている。腫瘍細胞が数日前に左側に注入され、従ってこの鼠はその脳の左側半部に神経腫瘍を発生する。右側半部は正常である。4角枠1は鼠の腫瘍の発生領域上に置き、4角枠2は正常な組織上に置く。図14Bはインドシアニンググリーン染料が鼠に手術中に注入された後1秒経過した差分像である。腫瘍組織を含む領域は無損傷頭蓋を経て直ちに見え得るようになる。図14Cは染料注入後5秒で染料が正常な組織および腫瘍組織に充滿していることを見ることが出来る。図14Dは、染料注入後1分経過して正常な組織が染料を消滅させるが、染料は腫瘍領域にまだ保持されている。この差分像中心の染料の濃度は緩慢で薄まる染料である。

図15は無損傷頭蓋を越る腫瘍組織対非腫瘍組織における染料取込みおよびクリアランスのダイナミック情報を説明する。この情報は図14Aから4角枠1および2により示される空間領域全体に亘る電磁放射線吸収平均の変化度の平均値をプロットして示す。電磁放射線吸収の増大は特定の時間における組織中の染料の濃度の関数である。グラフ“頭蓋外腫瘍”は図14Aから得た4角枠1内の吸収変化のダイナミクスをプロットして示し、グラフ“頭蓋外正常”は図14Aから得た4角枠2内の吸収変化のダイナミクスをプロットして示す。

図16は鼠神経腫瘍モデルにおける腫瘍領域対非腫瘍領域のダイナミック変化の

空間マップを示す。図16の一連の像は腫瘍組織および非腫瘍組織間の染料による吸収変化のダイナミック差を表す。図16Aは注目部位のグレースケール像を示す。これは図14に示す鼠と同一の鼠の像であるが、頭蓋は神経腫瘍を含む左側半球部を露出するために除去するが右側半球部には正常な組織が含まれている。4角枠1は腫瘍上に置き、4角枠2は腫瘍の周囲に置き、4角枠3は正常な組織上に置く。図16Bは1mg/kgのインドシアニンググリーンが鼠に静脈注入した後1秒経過した注目部位の差分像を示す。この初期時間中、腫瘍組織はまず染料の取込みが腫瘍組織に生ずることを表す測定可能な光学変化を最初に示す。グレースケールバーは差分像の列の光学変化の相対的な大きさを示す。図16Cおよび図16Dは染料注入後それぞれ4秒および30秒経過した注目部位の差分像を示す。これらの中間段では染料は正常組織および腫瘍組織の双方に集まる。図16Eおよび図16Fは染料注入後それぞれ1分および5分経過した注目部位の差分像を示す。これら後者の時間では染料は、これが正常組織から消滅になっていくも、いまだ腫瘍組織に集まっている。

図17は腫瘍組織対非腫瘍組織における染料取込みおよびクリアランスのダイナミック情報を示す。これは図16Aから4角枠1、2および3により示される空間領域全体に亘り平均化された電磁放射線吸収の変化度の平均値をプロットして示す。電磁放射線吸収の増大は特定の時間における組織中の染料の濃度の関数である。グラフ“腫瘍組織”は図16Aから得た4角枠2内の吸収変化のダイナミクスをプロットして示し、グラフ“正常な鼠”は図16Aから得た4角枠3内の吸収変化のダイナミクスをプロットして示す。

図18は切除された腫瘍組織の腫瘍細胞の残存痕跡を表す染料取込みのダイナミック像を示す。これは図14~17に示す同一の鼠での研究の継続である。図18Aは腫瘍が切除された後の鼠の左側半部の高倍大像を示す。4角枠1は残存腫瘍細胞の僅かな痕跡を含む領域上にあり、4角枠2は正常な組織のみを含む領域上に位置する。グレースケールバーは差分像の光学変化の量を示す。図18B、図18Cおよび図18Dは静脈内染料注入後4秒、30秒および60秒経過した腫瘍組織の差分像をそれぞれ示す。数回生検は好適な染料含有を示す領域からおよび染料が急速にクリアされた領域から採取する。これらの生検は置解析し、後に生検が保

取された箇所と照合する。染料がクリアされた領域から採取した生検は正常な細胞のみが含まれることを示し、染料が滞留した領域から採取した生検は腫瘍細胞が含まれることを示す。残留した極めて僅かな部分は腫瘍線部内でマップすることができる。

図19は腫瘍組織対非腫瘍組織での染料取込みおよびクリアランスのダイナミック情報を示す。これは図18Aから4角枠1および2によって示される空間領域に亘る電磁放射線吸収平均の変化度の平均値をプロットして示す。電磁放射線吸収の増大は特定の時間における組織中の染料の濃度の関数である。グラフ“線部腫瘍”は図18Aから得た4角枠1内の吸収変化のダイナミクスをプロットして示し、グラフ“線部正常”は図18Aから得た4角枠2内の吸収変化のダイナミクスをプロットして示す。このデータおよび図18から得たデータは本発明装置および方法によって極めて高い空間および時間解像度で腫瘍線部内で非腫瘍組織から腫瘍組織を識別し得ることを示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明は実時間でニューロン内在信号を撮像するとともに染料を用いる充実性腫瘍体の存在、大きさ、線部、元および等級を決める装置を提供する。さらに本発明は実時間で内在信号をマッピングすることにより患者の病質を機械的にマッピングする方法、生検のサンプリング誤り、または、創検者の凍結切片解析の遅延および可能な誤診断を行うことなく、実時間で充実性腫瘍組織の存在、大きさ、位置および等級付けを決める方法、および腫瘍細胞によって物理的に損傷を受けるか、または腫瘍細胞によって囲まれ、且つこれに隣接し得る神経組織を撮像する方法を提供する。本発明方法は、ビデオ入力ハードウェア像処理ハードウェアを含む一連の構成要素を具える同様の装置を用いる。ビデオ入力ハードウェアは例えばCCD(電荷結合装置)カメラのような光検出器(好適にはCOHUエレクトロニクスサンディエゴCA社製のCOHU 6500電子制御ボックスを有するCOHU 6510 CCD単色カメラ)とする。あるカメラでは、アナログ信号をAD1ボード(アナログ-デジタルボード)で8ビット用にデジタル化する。像処理ハードウェアは一般に“ホストコンピュータ”によって制御する。このホストコンピュータは、(インテル386、486、または良質なマイクロプロセッサ、即ち

、Sun SPARCを有するIBM PC型のような)任意の共通汎用コンピュータとする。このコンピュータは撮像ハードウェアでインターフェースされ、且つデータ流、計算、像取込み等を管理する撮像ハードウェアに命令をだす。これがため、ホストコンピュータによって撮像ハードウェアの操作を管理し、ユーザインターフェースを提供する。

#### 詳細

次に示すものは、共通に使用される項目の定義であり、イノウエ、“マイクロスコープ”プレナム プレス、ニューヨーク、1989年に記載されているように、そのアート アクセプテッド 処理法に従って本願に適用する。

**注目部位**は像のサブジェクトを具える組織の領域である。

**算術処理演算装置(A&U)**は像信号で多数の算術処理演算(例えば、和、差、排他、または定数乗算等)を極めて高速で行うハードウェア素子である。

**平均化制御像**はある時間周期に亘る実時間像列の平均値である更新可能な像である。

**電荷結合装置(CCD)**は小型ビデオカメラの撮像管に用いられる光感応リコンチップである。

**差分像**は平均化制御像から同時に次の像または特定の像を加算または減算することによって形成された操作可能な像である。

**フレーム**は単一ビデオ画の単一デジタル化アレイである。

**フレームバッファ**は平均化制御像、次の像または差分像のような1フレームの任意の記憶として作用するハードウェアの一部である。

**幾何学的変換**(GonzalezおよびWintz著、“デジタルイメージ処理”, Addison-Wesley Publishing Co., Reading, 1987)によって一般に像の画素間の空間関係を修正する。この理由で幾何学的変換はしばしば“ラバーシート変換”と称されている。その理由はこれら変換をラバーシート上に像を“プリント”し且つあらかじめ規定された規則に従ってこのシートを伸張するからである。ビデオ撮像に適用する際、次の像は動きのために歪んだものとしてみることができ、これら像を“ワープ”してこれらが参照像と同様となるようにする必要がある。幾何学的変換は、点変換によって画素値および/または位置にのみ基づく像の画素値を修

## 特表平7-507472 (8)

の絵お経のダイナミックスを増大して注目の領域のイベントを示すように処理された行の差分像である。

腫瘍縁部は外科医が腫瘍を摘出した箇所の領域である。

### 装置

本発明装置は1つのユニットまたは1群の構成要素として形成する。第1の構成要素は高強度電磁放射線源である。この放射線源によって充実性腫瘍組織を有するものと推測される部位のような皮膚表面、即ち、注目部位を照射する。種々の異なる内在信号は電磁放射線の種々の異なる波長によって照射することができる。さらに、電磁放射線源は腫瘍撮像方法用の染料によって吸収される電磁放射線の波長を含む必要がある。例えば、染料をインドシアニンググリーンとする場合には、好適な波長は約730 nm乃至約840 nmとする。他の染料に対しては、電磁放射線を照射する好適な波長は染料が吸収される波長を含むようにする必要がある。光の代わりに電磁放射線を用いることができる。その理由は可視光範囲の外側のスペクトルの赤外線領域で撮像することでもできるからである。

皮膚から内在信号を決める場合には、反射された電磁放射線はフィルタ処理して電磁放射線の選択された波長のみのビデオ撮像を行うことができる。電磁放射線の好適な選択波長は例えば500 nm乃至900 nm、さらに好適には近赤外線スペクトルを含む。一般に、一層長い波長（例えばほぼ800 nm）はによって一層深い皮膚活動を測定する。

さらに、0.75乃至1000  $\mu\text{m}$ の不可視領域の赤外線スペクトルの部分によって頭骨および硬膜を穿る内在信号を決め、これにより無傷の硬膜および頭骨を穿れ、且つ神経外科に關する危険性なく内在信号を決めるようにする。遠赤外線波長のこの範囲を用いる場合にはIR検出器は可視アナログカメラのCCDチップ以外の他の装置とする。IR検出器は酸化インジウムと、シリコン以外のテルル化ゲルマニウムおよび水銀カドミウムのような材料から造る。IR検出器はこれらが僅かな温度変化に感応するように低温冷却する必要がある。例えば、あるIR検出器系はIRC-04赤外線カメラ（シンシナチ エレクトロニクス、メイソン OH）とする。

熱が皮膚の表面に到達すると、皮膚はほぼ3-5  $\mu\text{m}$ または8-14  $\mu\text{m}$ の範囲

正するとともに他の要素値が変換に含まれないと云う点で“点変換”とは区別する。

像はフレームまたはフレーム列を処理して平均化制御像または次の平均化像を形成するようなデジタル化後に変更されたフレームの組合せである。

内在信号は内因性組織活動による神経組織の放射特性の検出可能な変化である。内在信号の主原因は例えば膜光解消、神経細胞膜脂質、ニューロン膜間のイオン束、血液容積変化、血液還元（ヘモグロビン対還元ヘモグロビン）、組織還元およびその組合せを含む。

輝度ヒストグラム伸張は2つの点（高、低）間の値をマップして完全な範囲の値（即ち、ダイナミック範囲）をカバーする変換である。例えば、低い値は零にマップし、高い値は255にマップし、中間の値は輝度値を線形に増大するようにマップする。低い値以下のすべての輝度値は零に設定し、高い値以上のすべての輝度値は高い値に設定する。

ルックアップテーブル（LUT）は各要素のグレー値を他のグレー値またはLUTによって特定されたカラーに変換するように管理されたメモリを記憶するように機能するハードウェアの一部である。LUTは（点処理アルゴリズムの慣例の実現方法のように）像のコントラストを処理し、像をしきい値化し、疑似カラー等を用いるようにプログラムすることができる。本発明の場合には、LUTはADIおよび/またはALUボードで速度に対して好適に実現する。

パラダイムによって特定の機能（例えば音声、言語、視覚等）をつかさどる皮膚組織の領域の電気的活動を変化せしめて内在信号と称されるものを増減させるようにする。

画素はデジタル化信号の各フレームにおける増減の個別のユニットである。各画素の強度は信号処理前の強度の強さに正比例するとともに特定の画素に相当する組織の特定の領域から反射された電磁放射線（光子）の量に相当する。像の画素はデジタル画像の最小のユニットであり、その出力強度は任意の値トスすることができる。CCD画素はCCDチップ上の最小の検出要素であり、そのアナログ出力はこれが検出される光子の数に正比例する。

処理された差分像は撮像または運動をフィルタ除去するとともに種々の要素値

の電磁放射線を放出する。この放出された放射線を撮像することも試みられた（例えば、ゴルフバック等による“脳皮質の赤外線マッピング”サーモグラフィ3:108、1989参照）。しかし、本発明によればこれら放出された波長をフィルタ処理し、且つCCD検出器の代わりにIR検出器を用いる。IR電磁放射線源は例えばレーザーフォトニクス、オルランドウ、FLから同調可能なIRダイオードレーザとする。撮像された波長は体熱および吸収変化の像とは異なり、電磁放射線散乱は本発明方法により得ることができる。無損傷皮膚および可能には骨を穿る腫瘍像の場合には、IRに吸収される染料（例えば、インドシアニンググリーン）を用いることができる。他の有効な染料には、例えば、ヘマトフォルフィン誘導体（HFD）から誘導され630 nmで光を吸収するフォトフリンセ、モノエスバチルクロライン-36（NPe、ニッポンベトロケミカル、日本）、ペンゾフォルフィン誘導体（BFD、クオドラ ロジック パンターバーBC）、エバンスブルーおよびその組合せがある。

好適には、電磁放射線源は、タングステン-ハロゲンランプのような高輝度の高輝度、広スペクトルの電磁放射線源および695 nm以下のすべての波長に対するカットオフフィルタで構成する。最も好適には、電磁放射線源をファイバオプティック手段によって注目部位に向けるようにする。かかる電磁放射線源の例は直流調整電源（Lambda, Inc.）により制御されるビームスプリッタを通過し且つ695 nmのロングパスフィルタを通過するファイバオプティック電磁放射線とする。

本発明装置は皮膚または注目部位のアナログビデオ信号を得る手段を含む。アナログビデオ信号を得る好適な装置は電荷結合装置（CCD）ビデオカメラであり、これによって例えば標準RS170コンベンションを用いるフレーム当たり512水平ラインを有する30Hzの出力ビデオ信号を発生する。かかる装置の1つはCCD-72ソリッドステートカメラ（Dage-MTI Inc., ミシガン シティ インディアナ）であり、他の1つはCOHU 6500（COHU、サンディエゴ、カリフォルニア）である。

注目部位は均等に照射して全ダイナミック範囲に亘り信号を良好に調整する必要がある。注目部位が不均等に照射される場合にはダイナミック範囲が制限され

ようになる。好適には、高輝度且つ拡散、即ち、均等な照射システムを用いる。注目部位全体に亘って均等な照射を得る技術は、例えばデジタル化像、制御点としての注目部位における一定な陰影グレイスケール点、カメラおよび/または電磁放射線源の前面の波長カットオフフィルタおよびその組合せ上の不均等照射を補償するための拡散照射像処理アルゴリズムを含む。好適には調整された電圧によって電磁放射線源の変動を防止する。フートプレートシステムは注目部位と接触しこれを保護して平坦な輪郭を形成する光学ガラス（減塵）である。このフートプレートによっても組織の動きを阻止する。

アナログ信号は先ず最初（アナログ信号のレベルでデジタル化前）の検出感度を最大として信号を増幅し、全ダイナミック範囲に亘り信号を延び、これにより装置の感度を増大する必要がある。（交流電力ラインからのような）60Hzの雑音はアナログフィルタにより制御ボックスでフィルタ除去する。さらに、かかる調整によっても電荷蓄積装置CCDからのアナログ信号を増強し、増幅し、条件付けする。入力アナログ信号を適宜に調整する手段の1つはビデオ速度（30Hz）でこの信号をデジタル化し且つアナログに変換し直すデジタル化像として注目部位を見ることである。

撮像処理中組織または患者の僅かな動きをも相償するのが重要である。患者の大きな動きはカメラを新たに方向付けして新たな平均化制御信号を得るようになる必要がある。動き補償は機械的手段または計算的手段あるいはその双方によって行うことができる。機械的手段は例えば注目部位にフートプレートを置き、この際フートプレートはフレーミング装置の減塵光学量ガラスを具えるおよび/または患者の骨フレームにカメラおよび電磁放射線源を固定することによって達成する。カメラおよび/または電磁放射線源を患者の骨構体に取付ける場合には任意の患者の動きは何等影響を受けない。その理由はカメラおよび照射線が注目部位に一定に向けられたままとするからである。フレームプレートの利点はこれによって動脈圧および/または呼吸により生ずる組織の動きを阻止するとともに脳脊髄液の無発による変化を防止することにある。計算手段は例えば注目部位の機械制御点およびこれら制御または結合点の動きの補償を行う三角形アルゴリズム、および各次の像を平均化制御像に幾何学的に置換して動きを補償する“像リ



## 特表平7-507472 (9)

ーピング”技術、および両技術の組合せを用いる。像ワーピング技術は例えばWolberg 著“デジタル像ワーピング”IEEEコンピュータ ソサイエティ プレス、ロスアラミトス カリフォルニア、1990に記載されている。さらに像ワーピング技術は平均化制御像に対し動きが大きすぎる際に用いられ、新たな平均化制御像をとる必要がある。制御点は内在信号解析に対し皮膚表面直接置かれるように注目部位に直接置くことができる。例えば、Goshtasby (“像登録用小片状線形マッピング機能”パターナ認識、第19巻、459-66頁、1986年)は制御点を用いる三角形領域に像を分割する方法を提案している。各三角形領域には個別に幾何学的変換を適用して各制御点を制御像の関連する三角形領域に空間的に置換する。

2つの像(平均化制御像および次の像)を減算前に調整列する場合にはアーティファクトが発生する。その理由は差分像が雑音および縁部情報を増幅する傾斜像と同様となるからである。像の調整列は患者の動き、心拍および呼吸から生じ得るものである。1つの解決策は患者の顔のように患者に固定された剛固なアセンブリにカメラを固定して患者の任意の動きに従ってカメラの視野が動き得るようにする。他の解決策は動き検出器による実時間の動き補償および像処理板による幾何学的変換を行うことである。簡単な翻訳または一層複雑な(従って一層正確な)アンワーピングを入力フレーム速度および平均化の量に依存して実現し得るようにする。

人体の組織を撮像(ニューロン活動または組織を流れる染料のダイナミックな撮像)する場合には、連続する像を得る間に生じ得る人体の動きを補償する必要がある。

多くの型の像に対してはxy面の並進運動によって像を変換する幾何学的補償を行うことができる。このようなアルゴリズムに対し実現可能とするために、周囲光の変化に対し(整数算術演算を好適に実現し得る)計算的に影響、メモリ影響および頑強とする必要がある。

1つの可能な方法は制御像に対する方向毎に画素の数0乃至kだけ像を並進運動させるようにする。 $(2 \times k + 1) \times (2 \times k + 1)$ の各々に対し、像減算を行い、あるメリットを計算して制御像に対する接近性を推測し得るようにする。か

かるメリットの1例は減算像の分散である。この方法の欠点はこれが充分でないことである。その理由は $(2 \times k + 1) \times (2 \times k + 1)$ 減算像の各々に対し、512  $\times$  512画素に亘る分散を計算する必要がある。

このアルゴリズムの有効な改善は、各領域が制御像に対し並進運動を必要とする像からの少数の画素(即ち、 $8 \times 8$ )より成る注目部位(例えば9つの注目部位)のある僅かな数を任意に選択することによって減算像の分散を推測する必要がある。また、制御像のこの関連する注目部位に対しこれら小さな注目部位を並進運動するある深さ(例えば10画素)を選択する。0乃至10画素に対する可能な方向の並進運動後、選択された注目部位全体に亘る分散を最小にする並進運動を選択する。注目部位のすべてが同一の大きさであるため、最小の分散を選択し得るように順序付けする必要がある分散の計算に除算は必要でない。従ってすべての計算は整数算術演算で行うことができる。注目部位が充分小さいため、データの大部分はフレームバッファおよび増大速度に対しI/Oを制限するホストコンピュータのRAMに記憶することができる。

他の問題は組織表面の照射を確実に均等にすることである。照射源の変動から不均等が生じ、強度分散は組織表面の3次元特性から生じる。照射源の変動は、光フィードバック機構を用いて照射源の供給電力を調整することによってアドレス指定する。これら問題の双方は像処理モジュールで補償することもできる。アナログビデオ信号は信号処理手段に絶えず供給する。データを得て解析するかかる手段の1つは像解析機(例えば、シリーズ151 像プロセッサ、イメーjing テクノロジー、インコーポレーション、ボープルン、イリノイ)である。像解析機はアナログデジタルインターフェースでアナログビデオ信号を受けてデジタル化し、且つ1秒のほぼ1/30のフレーム速度(例えば30Hzまたは“ビデオ速度”)でかかる機能を実行する。信号の処理には、まず最初、画素に割当てられた注目部位の部分から反射されない光子の数(即ち、電磁放射線の量)に依存する(2次元の)値を割当てた一連の画素、即ち、小さな正方形にデジタル化する。例えば、現在のテクノロジーCCDから標準512  $\times$  512像において、像当たり262,144個の画素が存在する。8ビットシステムでは、各画素は8ビットで表わされる。このCCDは冷却して熱雑音を減少させることができる。

体の入力として用いて再び他の像と組合せるようにする。

かかる像を減算する前に、デジタル化像で患者の動きを補償するのが重要である。これがため、像に幾何学的変換を施してこれら像を減算前に幾何学的に置換する。

本発明装置は実時間モジュラープロセッサまたは高速CPUチップを像プロセッサに加えることによって差分フレームを形成する処理速度を増強することができる。例えば1つの実時間モジュラープロセッサを150 RTMP-150 リアルタイムモジュラープロセッサ(イメーjing テクノロジー、Woburn, マサチューセッツ)とする。

さらに処理手段は差分像のヒストグラム伸張(例えば、ヒストグラム/フィータイクストラクタ HFD-151-1-Vモジュール、イメーjing テクノロジー、Woburn, マサチューセッツ)を行って各差分像をそのダイナミック範囲に亘って増強する。線形ヒストグラム伸張は例えばグリーンによる“デジタル像処理: システムアプローチ”ファン ノストラッド ラインフォルド、ニューヨーク、1983年に記載されている。ヒストグラム伸張によって最も明るい画素、即ち、差分像の最高値を有する画素を割当てるとともにこれに最大値を割当てる。最小の画素値には最小値を割当てその間の全ての他の値には(線形ヒストグラム伸張に対し)最大値および最小値間の直線的な値(およびlog ヒストグラム伸張に対し対数値等)を割当てる。これにより差分像によって絶対変化に対し供給される全ダイナミック範囲を完全に用い得るようにする。

像処理システムによって得られる、または、開発下のハードウェアの多様体を用いることができる。例えば、テキサス インストラメント マルチメディアビデオ プロセッサ(MVP)が動きビデオ用途に対して開発されている。MVPによって内部アーキテクチャを高度に平行とし、オンチップメモリを大きくし、CPU内でCPUメモリおよびI/O装置間の通信の帯域幅を極めて広くし、実時間ビデオ圧縮標準および実時間像捕捉、処理並びに可視化の要求を支持するために必要な毎秒20億以上のRISC型演算特性をし得るようにする。例えば、ハードウェアはVMEバスへのインターフェースを有するプリント回路板モジュールを具えることができる。単一シャーシによって全部のモジュールを収容し、手

好適には、信号処理手段は、白黒像で表わされるグレイ符号化画素値を各グレイ符号化値の強度に基づくカラー符号化値に変換する値で初期化されたプログラマブルアップテーブル(例えば、CM150-LUT16、イメーjing テクノロジー、ボープルン、マイアミ)を含む。これによって像伸張により像増強を行う。像伸張は、デジタル像フレームの各画素を表わすために用いられる最高および最低の画素強度値を伸張すべき像フレームの領域全体に亘って決めるようにする。選択された領域を値の大きな範囲に亘って伸張することにより例えば雑音による比較的高いスプリアス値を容易に識別し、且つ除去することができる。受信した各像を、例えば画素の512  $\times$  512 アレイとして表わされるデータ素子のフレームとしてフレームバッファ、好適にはCPUの文脈内に記憶する。各画素は256グレイレベルの1つに相当する8ビット値を有する。

さらに処理手段はA/Dインターフェースから受けたデジタル化像データのフレームを記憶するフレーム記憶領域を有する複数のフレームバッファを具える。フレーム記憶領域は少なくとも1メガバイトの記憶スペースおよび好適には少なくとも8メガバイトの記憶スペースを具える。追加の16ビットフレーム記憶領域は、8ビット以上で表わされる画素強度を有する処理された像フレームを記憶するアキュムレータとするのが好適である。フレームバッファは一時的な高速メモリとする。処理手段は少なくとも3つのフレームバッファを含む。そのうちの1つのバッファは平均化制御像を記憶し、他のバッファは次の像を記憶し、3番目のバッファは平均化制御像および次の像間の差分像を記憶する。

さらに処理手段は1つ以上のフレームバッファに位置するデータから算術演算(加算、減算等)機能および論理(AND、OR等)機能を呈する算術論理演算ユニット(ALLU)(例えば、ALLU-150 パイプラインプロセッサ)を含む。ALLUは高速プロセッサとする。ALLUによって実時間で像平均化を行う。例えば、新たに到来するデジタル化像ALLUに直接送るとともに双方の像をALLUに通過させて加算することによりフレームバッファに位置する平均化制御像に対する加算または減算を行う。最後の像を加算した後、この16ビットの結果を再びALLUに送ってALLUによりこの結果を定数(即ち、像の総数)で除算する。ALLUからの出力はフレームバッファに記憶してさらに処理を施すか、またはそれ自

術室内または手術室間で容易に搬送し得るとともに表示モニタおよび周辺入出力装置を有するラックに設け得るようにする。実時間システムは例えば取得（アジジョン）、像処理、周辺制御およびホストコンピュータに対する1つのボードを具える。処理能力を低減する最小の構成は取得ボードおよびホストコンピュータボードのみを具えることである。取得ボードは到来ビデオフレームの実時間平均化を行い、且つ最大速度のバスで平均化フレームを送出することである。VMEバスが好適な理由はそのピーク帯域幅（最も遅い修正に対して80Mバイト/秒以上、VME64）が高く、且つ多数の存在するVMEバスと互換性がよいからである。取得ボードは可変走査インターフェースを経て多くの種々の型のカメラを支承する必要がある。ドータボードによって多くの種々の型のカメラのインターフェースの必要性を支承することができ、且つ可変走査信号を取得マザーボードに供給することができる。好適には、ユニットはRS-170Aビデオ信号へのインターフェースを行うドータボードを具え、カメラの広い基盤を支持し得るようにする。高い空間/コントラスト解像度および/または良好な信号対雑音比を有する低雑音カメラのような他の型のカメラを用い、これを本発明装置に組込むことができるとともに改善したドータボードにかように改善したカメラを組込むこともできる。

ホストコンピュータはVMEインターフェースを有する単一ボード建設コンピュータを具える。好適には、このホストコンピュータはバス帯域幅の考慮に依存するVME64インターフェースまたは標準（IEEE 1014-1987）VMEインターフェースを具える。ホストコンピュータボードの例は例えばフォーエスSPARC/CPU-2EおよびHP9000モデル7471を含む。ユーザのインターフェースは例えばユニックス/X-ウィンドウ環境とすることができる。像処理ボードは例えばテキサスインスツルメンツMVPおよび他のチップに基づき、実時間像平均化、登録、および手術中見え得るようにするために高品質の差分像を発生させるために必要な他の処理を実行し得るようにする。このボードも120×120 RGB表示装置を駆動してハイレイト腫瘍組織に対する疑似カラーマッピングを有する一連の差分像を示す。好適にはホストコンピュータに第2モニタを用いてスクリーンリアル箇所全体を増大し且つユーザのインターフェースを円滑にし得るよう

にする。処理ボード（完全にプログラマブルである）によってVME64マスタインターフェースを支持して他のボードと相俟ってデータ転送を制御することができる。最後に、周辺制御ボードによって電気的なインターフェースを設けてホストコンピュータから機械的なインターフェースを制御することができる。かかる機械的なインターフェースは例えば染料注入用のコンピュータ制御モータ駆動シュリンジおよびカメラ制御ボックスを具える。

差分像は好適にはさらに処理して像を円滑にするとともに高周波雑音を除去する。例えば、低域通過空間フィルタは高い空間周波数および/または低い空間周波数を阻止してダイナミック範囲の両端で高周波雑音を除去し得るようにする。これにより円滑に処理された差分像（デジタルフォーマットで）を提供することができる。デジタル処理された差分像はカラーのスペクトルをグレイの異なる陰影に割当てることによりカラー符号化することができる。次いでこの像を（AD1ボードにより）アナログ像に再び変換し戻して、平均化制御像および次の像間の差を実時間で可視化する。さらに処理された差分像はアナログ像全体に亘り重畳して注目部位のビデオ表示時に領域の染料が迅速に取込まれる際に、または内在信号が正の方向に増大する特定の組織箇所を表示し得るようにする。同様に、神経活動が減少すると組織の電磁放射線吸収容量が減少する（即ち、組織が一層明るくなり、内在信号が負となる）。例えば、像Aを次の平均化像とするとともに像Bを平均化制御像とする。通常は、像Aの画素が像Bの画素から減算するとともに負の値を発生し、この値を零として処理する。従って差分像によって禁止領域を考慮することはできない。しかし、本発明によれば、負および正の内在信号を確認する方法を提供し、この方法によれば、（a）像B（平均化制御像）から像A（次の平均化像）を減算して第1の差分像を形成し、これにより全ての負の画素値を零とし、（b）像Aから像Bを減算して第2の差分像を形成し、これにより全ての負の画素値を零とし、且つ第1および第2の画素値を加算して“和の差分像”を形成する。和の差分像は増大する活動（即ち、黄、オレンジ、赤のような暖色系のカラーで符号化されたカラー）の領域を示し、減少する活動（即ち、緑、青、パープルのような寒色系のカラーで符号化されたカラー）の領域または禁止領域を成す。或は又、第2の差分像に第1の差分像を重ねることがで

きる。何れの方法によっても増大したニューロン活動おれんじ減少した活動の像を提供することができる。

好適には、処理手段はデジタル像データを記憶する光学ディスク、デジタルおよび/またはアナログビデオ像のハードコピーを提供するプリンタ、および装置の（アナログ信号に逆変換された）差分フレーム出力を連続的にモニタするようにしたモニタとを更に具える。この差分フレーム出力は実時間アナログビデオ像上に重畳して冷凍時にカラー符号化差分フレームで重畳された注目部位（例えば皮膚表面または推定された腫瘍箇所）のビデオ像を形成し、迅速な染料取込み部位が発生し、且つある刺激またはパラダイムに反応して内在信号が存在することを示すことができる。

外科処置中、患者が動く場合がしばしばある。麻酔処置された患者の場合には、動きはしばしば呼吸および血流に依存する。覚醒した患者の場合には追加の動きが生ずる。この動きはデジタル画像で補償されるため、これら像は減算前に幾何学的に位置合わせすることができる。この幾何学的補償はデジタル画像に幾何学的変換を施すことによって達成される。幾何学的変換を実時間で実行し得る像処理ハードウェアの一部はGP-150幾何学的処理ボード（Informatique et Techniques Avancées, Issy-les-Moulineaux, France）である。このGP-150幾何学的処理ボードはイタックスハードウェアと両立し、且つ実時間回転、並進、ズーム、および512×512×8ビット像での取一次補間による2次元補正を遂行する。画像方法

実定性腫瘍を撮像する方法は注目部位の推定腫瘍箇所を循環する血管（例えば動脈または静脈）にボラス注入により染料を周期的に導入することを含む。好適には、染料は比較的短い半減期（例えば5分以下）を有し、且つ迅速にクリアされて排泄し導入を可能とする。本発明装置のビデオCCDは推定された充実性腫瘍箇所（注入部位）上に集束され、且つ染料により吸収される波長を含む高強度の電磁放射線によって上記腫瘍箇所を照射する。染料の導入直前に第1の平均化像を取出し、デジタル化し、フレームバッファに記憶する。染料は迅速に注入されて直ちにボラスとなる。次の像フレームを取出して記憶し、減算的に比較して本発明処理手段を用いる差分像（例えば1秒当たり1つまたは2つ）を形

成する。染料の初期可視化はまず最初腫瘍組織の差分像に現われる。その理由は染料が一層迅速に腫瘍組織に蓄積するからである。充実性腫瘍の縁部は充実性腫瘍マスを概略する陰影付きのラインとして差分フレームに現われる第1像となる。この差分フレームを冷凍して記憶し、外科医が腫瘍像を鑑別して手術中に実時間で腫瘍縁部を確認し得るようにする。さらに、染料は正常な組織に比べて腫瘍組織で長期間に亘り残存する。これがため、正常な組織および腫瘍組織の双方において注入部位を通過する染料が一般に現われた後腫瘍組織の染料クリアランスが遅延し、これにより腫瘍組織に存在し、正常な組織に存在しない染料によって腫瘍存在を可視化する他の機会を得ることができる。一層侵略的な悪性の腫瘍では、腫瘍の等級が高くなればなるほど染料が腫瘍組織の一層長く残存するようになる。等級が低く一層良性の腫瘍に対しては、染料は腫瘍組織に45秒乃至2分間残存するが、一層悪性の腫瘍では染料は10分間も残存するようになる。

本発明方法はMRI（磁気共鳴撮像）のような腫瘍第1撮像技術を確認するのに極めて好適である。その理由は光学的撮像によって現在のMRI技術（MRIは手術中の技術ではない）で識別し得なかった等級の低い腫瘍を識別し得るとともに更新した像を染料の再導入による外科的処置中連続して用いることができるからである。この染料は抽出が開始されて残留腫瘍組織に対し抽出箇所を視る外科的処置中複数回導入することができる。CNS腫瘍に対してはMRI技術によってかかる腫瘍を撮像し得る血液脳関門を妥協した進行期の腫瘍に必要である。コントラストによる本発明光学的撮像方法は血液脳関門とまだ妥協しない低い等級の腫瘍をも撮像することができる。これがため、この光学的撮像はMRIよりも一層悪度のよい技術であり、手術中の使用し得、且つ腫瘍を等級化する好適な手段を提供することができる。

染料は生体内導入に対し安全であり且つ静脈内導入または動脈内動脈内に短い半減期を有する電磁放射線吸収染料とする。かかる染料の1例には、インドシアニングリーン、フォトフリン®、NPe<sub>6</sub>、BPD、エバンスブルーおよびその組合せがある。さらに、充実性腫瘍の外科的抽出中、染料は注入部位から迅速にクリアされるのが重要である。斯様に、染料導入を繰返して抽出中残留腫瘍組織を決めるようにするのが重要である。

画像観測中患者、特に児童患者の動きを考慮して、平均化像フレームを連続的に更新するのが重要である。これがため、残留染料の循環、患者の動きまたは外科的処置による組織の動きを考慮する。

例えば、腫瘍組織を可視化する本発明方法は、前項の脳神経腫瘍モデルに用いて本発明方法の可能性をテストし、腫瘍組織から正常なまたは水溶性の脳を識別するとともに全ての可視腫瘍病変後異常な腫瘍から正常な腫瘍を本発明方法により分離するかどうかを決めるようにする。脳の血管を流る染料の濃度のダイナミックな性質によって正常な脳および腫瘍組織の識別を行う。さらに、 $20\mu\text{m}^2$  /画素以下の光学像の空間解像度のため、残留腫瘍の小さな領域をも確認することができる。さらに、腫瘍組織を無損傷顕像を経て確認し得るため、外科的手術前に腫瘍撮像を行う方法および装置を提供することができる。理論に縛られることなく、正常な脳組織周囲および腫瘍組織を流る染料濃度のダイナミックな差を次に示す4つの理由の任意の1つまたはその組合せに対し考慮する必要がある。

- (1) 機能不全腫瘍毛細血管を流る染料の大きな漏出、
- (2) 腫瘍組織による染料の著しく迅速な取込み、
- (3) 腫瘍組織を流る緩慢な伝搬回数、
- (4) 腫瘍細胞による染料の好適な取込み。

鼠の神経組織モデルを検査し、微小血管系を正常な皮質と比較する。腫瘍組織の血流は正常な組織のものよりも一層緩やかであり、且つ一層変化し得る。腫瘍と正常な脳との相違は腫瘍の位置、浸潤度、壊死に寄与する。鼠の脳に移植されたC6大神経膠細胞の培養球を用いる他の研究では、血流は正常な鼠の脳よりも生体腫瘍で一層緩やかとなる。微小血管の容積率は腫瘍と正常な脳との間で等価となる。しかし、腫瘍のはば50%のみが活性的に灌流するため、腫瘍の灌流した微小血管の表面積は正常な鼠のものの1/2であった。これらの変化は腫瘍と比較して正常な脳により一層迅速にクリアされるようになる。

腫瘍毛細血管の透過率は正常な鼠のものよりも著しく高い。これら毛細血管の機能不全によって大きな粒子の滞留を生じ、その結果水腫が生じ、且つ腫瘍の微小血管を囲む割込み圧が増大するようになる。腫瘍の微小血管は正常な細胞膜の

平滑筋を含まないため、これらも圧力傾度の局部制御を有さなくなる。これによっても腫瘍組織に血流停止を生じるようになる。染料濃度の総合効果によって正常な脳のものよりも走行時間が長く且つ腫瘍組織からの大きな光学信号の持続時間が増大して長くなる。かかる理由によって染料濃度中にみられた腫瘍および正常な脳からの光学信号のダイナミックな変化を支持するようになる。この場合腫瘍組織にはば等価な取込みおよび十分に緩やかな走行時間が生じ、従って光学信号に長い増加が生じる。また、腫瘍を囲む組織は機能不全の毛細血管なく割込み圧の増加が期待され、且つ腫瘍組織が光学変化の中間期間を有すると云う事実に従って他の微小血管系が変化するようになる。

正常な脳からの染料の一層迅速なクリアランス機構が発生するかどうか、または染料が腫瘍細胞によって好適に隔離されるかどうかは明らかではない。後者の場合にはヘマトポルフィリンが腫瘍細胞内に好適に取込まれるようになるとともにかかる細胞にフォトダイナミック療法を用いる可能性を考慮する。染料が腫瘍内に完全に残留する場合には正常な細胞および腫瘍細胞間に染料の極めて不均一な分布が期待されるようになる。しかし、一層大きなパイル微小血管間の領域からとられた中間像からはその反対のことが観察された。

さらに、本発明によれば既述したてんかん活動の領域のような皮質機能領域および機能不全領域を撮像する方法を提供する。この方法によれば特定の皮質機能不全をマッピングし、またはてんかん患者のてんかん活動の位置である機能亢進領域を確認する感知信号を導入する。皮質のてんかん発作領域は自然に一層活動的なものとして可視化され且つ皮質活動の内在信号をマッピングする方法を用いる本発明方法によって撮像することができる。

内在信号を可視化する方法には特定のパラダイムによって皮質組織を刺激することが含まれる。種々のパラダイムは例えば物体の陰を患者にみせ、且つ物体の名称を患者に尋ねてニューラル活動を変更し、これにより関連する内在信号を形成する。

本発明方法および装置の他の特徴は抹消神経の損傷およびスカーリングを撮像し得ることである。中枢神経系および抹消神経系(PNS)の神経は損傷後に再生する可能性によって特徴づけられている。損傷した抹消または顔面神経を修復

する手術中内在信号のブロックの領域を撮像することによって神経損傷領域を撮像することができる。例えばこの神経は注目部位に露出される。神経は損傷箇所の上流を刺激する。活動的な神経経路は活性化後の処理された差分フレームの内在信号によって撮像する。神経損傷またはブロックの箇所は損傷箇所の内在信号に対する急激な腫瘍または下降によって明らかである。同様にして外科医は神経損傷が存在する箇所の情報を実時間で詳しく得ることができ、可能であれば損傷を修正することができる。

さらに、神経組織を囲むかまたはこれに隣接して位置する腫瘍組織を除去する必要がある場合には、本発明装置および内在信号を撮像する可能性を用いることができる。例えば、聴神経鞘腫と称される腫瘍は通常内耳(聴覚)神経を囲んで位置している。内耳神経(脳神経)を損傷することなく、且つ耳を聴能にするかまたは顔面動かし筋内を刺激する顔面神経を損傷することなく腫瘍組織を除去するのは困難な処置である場合が多い。本発明方法によって染料を用いる神経組織の原因から腫瘍組織を識別する可能性を提供する。さらに、本発明方法によれば、内耳神経用の音声パラダイムにより神経を連続的にまたは周期的に刺激するか、または顔面筋から顔面神経を運動させ、且つ神経活動に関連する内在信号を検出することによって内耳神経または顔面神経の正確な位置を示す情報を外科医に連続的に示すことができる。従って、神経組織の最も近くに腫瘍組織が存在する場合に染料により腫瘍組織を位置決めするとともに同一の撮像装置を用いる内在信号を検出することによって神経組織を位置決めすることができる。

撮像方法によって注目部位の表面の情報を得るとともに組織の深いレベル箇所において注目部位をターゲットすることができる。像(平均化制御像および次の平均化像)を形成するために用いる電磁放射線の長い波長を用いて組織の深い箇所にある注目部位をプロブする。さらに、500 nmで見られる像および700 nmで見られる像間に差分像が得られる場合にはこの差分像は組織の光学的スライスを示す。さらに、カットオフフィルタを用いる代わりに、染料の導入を電磁放射線の組織フィルタとして作動させて注目部位にフィルタを設ける。この場合には、長期間に亘り腫瘍または正常な組織に残留する染料を用いる必要がある。

さらに本発明方法によれば、腫瘍組織から得た像または内在信号差分像の感度

およびコントラストを増強するに当たり、(a)少なくとも電磁放射線の第1波長および第2波長を含む放射線の複数の波長により注目部位を照射し、(b)電磁放射線の第1波長から得た第1フレーム列および電磁放射線の第2波長から得た第2フレーム列等を含む電磁放射線の各波長に相当するフレーム列を導、(c)第1フレーム列、第2フレーム列等を処理して第1平均化制御像、第2平均化制御像等を形成し、(d)内在信号を刺激するかまたは腫瘍組織像に対する染料を導入し、(e)電磁放射線の第1波長を用いる第1列の次のフレーム、電磁放射線の第2波長を用いる第2列の次のフレーム、等を得るとともに第1、第2等の次のフレーム列を処理して第1、第2等の次の平均化像をそれぞれ形成し、(f)第1の次の平均化像、第2の次の平均化像、等から第1の平均化制御像、第2の平均化制御像、等をそれぞれ減算して第1の差分像、第2の差分像、等をそれぞれ形成し、(g)第2の差分像に対する第1の差分像の比をとることにより増強された差分像を得るようにする。この方法は例えば電磁放射線の2つの単一波長源によるか、または電磁放射線の広い多波長源および複数の長パスフィルタを用いることによって達成することができる。好適には、注目部位を照射する単色電磁放射線をレーザ源とする。

内在信号および腫瘍組織を撮像する本発明装置および方法は外科処置設定の外で用いることができる。特に、無損傷皮膚および骨を流る腫瘍撮像を行うことができる。該機体のある領域では、長い波長の可視光および近赤外電磁放射線を、乳房組織のようなかかる撮像組織に容易に通過させることができる。染料を注入すると、腫瘍組織のような膨張血管部位を確認することができる。

本発明方法の他の例では、抗体のようなターゲット分子に共役の電磁放射線吸収、即ち、蛍光染料、または特に腫瘍細胞の抗原表面マーカーに特定のモノクローナル抗体またはそのフラグメントを用いるようにする。蛍光染料の励起波長(放出波長ではない)を含む電磁放射線によって注目部位を照射する。この際は電磁放射線源上にカットオフフィルタを用いることによって行う。好適にはCCDカメラを像増強器またはマイクロチャネルプレート(例えば、KS-1381ビデオスコープインターナショナル、ワシントン、DC)に結合してシステムの感度を数オーダー増大し、且つこれに加えた蛍光染料を有する組織を可視化する。タ

一ゲット分子と共役となり得る蛍光染料の例は例えばモレキュラー ブローブ ユーゲン O R から販売されているカスケードブルー、テキサスレッドおよびリシファイエローCHである。

本発明装置はさらに他の用途に適用することができる。例えば装置を皮膚（例えば、図1および2参照）の電気的刺激に用いる電極の校正に使用することができる。覚醒患者の皮膚の機能的体制をマップするために外科医が現在使用している技術は皮膚の表面に（刺激電極を経て）電流を直接供給することである。外科医はてんかん発作をトリガすることなく、または組織に損傷を生ぜしめることなくできるだけ最大強度の刺激電流を供給するようにする。刺激電極を校正する方法としては、外科医は、可変強度の電流を患者の皮膚に供給するとともに患者の脳の表面に直接設置された記録電極の出力を観察しながら電気的活動をモニタする。外科医は刺激電極により数秒間電流を供給するとともに刺激停止後のある期間に亘り持続し得る刺激後のてんかん活動に対し記録電極からの出力をチェックする。本発明装置によれば、電極刺激電流により皮膚が受ける空間程度および刺激電流停止後持続する刺激で誘発される活動の時間コース（所望に依り）をモニタする正確な手段を設ける。この方法では、刺激前の制御像を得、次いで刺激中または後に次の像を得る。像はここで説明したように処理して休息活動が供給された刺激電流により影響を受ける皮膚のこれら部位の高解像度空間マップを提供する。また、本発明装置は外科医が電極に対する適宜の刺激電流を選択するために用い得る刺激およびてんかん活動の空間的程度および時間コースのマップを提供する。

さらに、血管の血流のダイナミック変化および内在光学変化を用いる皮膚活動を瞬時空間マッピングする本発明装置を使用することができる。（例えば、図1および図2参照）。理論によって規制されることなく、大きな血管の領域内の内在光学変化は、これら血管内の血流速の変化割合に依存する。本発明によれば個別の血管内の血流速の変化をモニタする方法を提供する。

また、本発明は神経外科処置中麻酔をかけられた患者の皮膚の機能体制をマップする方法を実施する装置を使用することもできる（例えば、図5参照）。この方法によれば、求心性知覚入力処理するに特定の皮膚領域を活性化する求心性

知覚刺激を行うとともに本発明方法および装置で観測された誘発内在信号を求心性知覚刺激に含まれる皮膚の領域を光学的にマップする。

例えば、腫瘍の外科的摘出中、外科医は皮膚のどの部位が麻酔された患者の脚部からの知覚入力の処理に含まれるかを知らなければならない。従って外科医は振動刺激のような求心性知覚入力を脚部に供給して情報の伝達を脚部の知覚処理に含まれる皮膚の該当部分に生ぜしめるようにする。この知覚刺激は本発明方法および装置を用いてマップし得る皮膚の適宜の領域を活性化する。求心性知覚入力の他の例によれば、脳中枢を活性化するために音響的刺激を行うとともに視中枢をマップするために視覚刺激を行い、しかも間接等を動かすようにする。この方法は麻酔された患者のある機能部位をマッピングするのに有利である。

さらに、腫瘍縁部からの試験切除を行う際に手術中の外科医の手助けとなる方法を実施する本発明装置を使用することもできる（例えば、図12参照）。腫瘍の外科的摘出後、外科医は腫瘍縁部からのどの部位が腫瘍組織の残遺物を含むかを識別し得るようになる。これが重要となる理由は、多くの腫瘍の型において、手術後の照射および化学療法の有効性を腫瘍組織残遺量に対して相関すると考えられるからである。腫瘍のこれら残遺物を確認する現在の技術では、外科医は僅かな量の組織を任意のサンプリングで取出して試験者への検査用としてこれらサンプルを送るようになる。このサンプリングおよび検査は外科手術中に行う必要がある。その理由は外科医はこの情報に基づいてどの組織をさらに摘出する必要があるかを決定する必要があるからである。この技術によれば、外科手術に必要な時間が短縮されて費用が減り、且つ患者への危険が増大する等のいくつかの欠点があり、しかも、試験切除を決める任意のサンプリング法はサンプリング誤りが避けがたいものとなる。本発明によれば、腫瘍縁部の内の残遺腫瘍組織の箇所を迅速に決める方法を提供する。これは、組織のどの部位を試験切除の目的でサンプリングするか、およびどの部位を腫瘍組織が含まれるものとして直ちに摘出する必要があるかに関する外科的決定の手助けとなる。

#### 例1

この例は皮膚の直接の電気刺激による被験体の光学変化を示す。皮膚表面の電気的な記録（表面EEG、ECOG）は光学変化と相関する。図1および2は

皮膚の直接の電気刺激中およびてんかん発作活動中、人の皮膚の内在光学性質のダイナミック変化を示す。図A、B、C、およびDは本発明装置を使用して覚醒または麻酔神経外科処置中人の皮膚の内在光学変化の高空間解像度を有するダイナミック情報を提供する代表的な光学画像法を示す。図1において、内在信号変化は刺激—電極“校正”中、覚醒された患者に誘発する。4つの刺激試行は皮膚表面に逐次供給し、各刺激によっててんかん発作を誘発する。刺激試行は次のものから成る。（1）ある期間に亘り記録電極の出力を観察することにより休息皮膚活動度をモニタし、（2）電流を刺激電極を経て数秒間に亘り皮膚表面に供給し、（3）刺激停止後ある期間に亘り記録電極の出力をモニタする。

一連の像（各像は30112で得られた128 フレームの平均値より成る）は4つの刺激試行の各々中に得る。最初の3つの刺激試行に対しては6 mAの電流を用い、4番目の刺激試行に対しては8 mAの電流を用いる。一連の3—6像より成る平均化制御像を得た後、放電活動後にてんかんが誘発されるまで（表面電極によって記録される）、バイポーラ皮膚刺激電流（6 mA または 8 mA）を供給する。像は4つの刺激試行の各々連続的に得られた。

各画像に対する光の吸収変化度を4つの刺激試行中に得られた各像に対し計算する。（図1Aにマークした4つの正方形領域によって示される）4つの部位に亘る平均変化度をこれら4つの空間的部位に発生するダイナミック変化の比較および解析のために、図1B、1Cおよび1Dにグラフ的にプロットして示す。

図1Aは1つの記録電極（r）と、2つの刺激電極（s）と、これら領域全体に亘る吸収の平均変化度が決まる4つの箇所（4角枠で囲んだ領域1、2、3および4）とを有する顔面運動皮膚の直前の人の皮膚を示す。皮膚は電極放射線＜690 nmで照射した。スケールバーは1 cmである。

図1Bは図1Aに示す4角枠1および3の空間領域における電極放射線吸収の変化度（毎秒）をプロットして示す。両領域に對し、ピーク変化は最大量の刺激電流が誘起された4つの刺激試行（8 mA）中最も長いてんかん発作後の活動である。4角枠3内の変化度は4角枠1内の変化度よりも大きく且つ一層長かった。4角枠3はてんかん病巣領域（患者のてんかんに対し応答可能な組織の励起可能な領域）上に位置していた。

図1Cは図1Aに示す4角枠1および4の空間領域における電極放射線吸収の変化度（毎秒）をプロットして示す。4角枠1は2つの刺激電極間の皮膚組織の領域上に位置し、4角枠4は血管上に位置する。4角枠4内の変化度は4角枠1よりも充分大きく、その反対方向にある。また、これらの変化度は刺激電流およびてんかん発作後の活動の大きさによって等級化される。4角枠4内の変化度は血管内の血流速度の変化に著しく依存するため、このプロットは本発明が皮膚活動および血流を同時にモニタし得ることを示す。

図1Dは図1Aに示す4角枠1および2の空間領域における電極放射線吸収の変化度（毎秒）をプロットして示す。これら2つの領域が互いに近接しているにもかかわらず、これらの光学的変化は6 mAの電流を用いる最初の3つの刺激試行中反対方向にある。4角枠2の領域内の負に向かう変化は本発明を用いて皮膚活動および筋起の禁止をモニタすることができることを示す。

本例に記載された全ての画像処理および患者の承認フォームはユニバーシティ オブ ワシントン ヒューマン サブジェクト REVIEW コミットティによって再検査され、且つ承認された。全ての患者は外科手術および画像の実験の双方に対するインフォームド コンセント ステートメントを署名した。皮膚は直流調整電源（Lambda, Inc.）により制御され且つ695 nmロングパスフィルタを通過したビームスプリッタを通過するファイバーオプティック電極放射線によって均等に照射した。像は特別に修正されたシネアダプタにより手術用顕微鏡に固定されたCCDカメラ（COHU 95000）により得た。皮膚はガラスフットプレートによって安定化した。像は30 Hzで得て、8ビット（Imaging Technology Inc. Series 151 system, Woburn MAを用いる512 × 480 画素）でデジタル化した。幾何学的変換を像に適用して患者の動きの少量を補償する（Nohlberg, “デジタルイメージング” I.E.E.E. Computer Society, Los Alamitos, CA, 1988）。制御像による次の除算により制御状態中に得た像から刺激状態中（皮膚表面刺激、舌の運動またはネーミング中）に得た像を減算することにより差分マップ度を得た。生のデータ（即ち、デジタル化しない）は特定の領域（平均寸法の4角枠は30 × 30画素または150 — 250  $\mu\text{m}^2$ ）の平均光学変化を決めるために用いた。疑似カラー像に対しては、線形ロウパスフィルタによって高周波雑音を除去する



識別することができる。

従って、本発明装置によれば低級腫瘍でも撮像することができる。この腫瘍組織の次の病理学検査によりこの腫瘍が低級腫瘍であることを確かめた。

#### 例 3

本例は極めて悪性の CNS 腫瘍（神経膠腫）の像を示す。患者を例 1 につき述べたように神経外科方法で撮像した。腫瘍撮像方法は例 2 と同一にした。図 11 に示す一連の像は悪性 CNS 腫瘍（神経膠腫、星状細胞腫、等級 IV）を有する患者の頭皮から得られたものである。図 11A（左上）は、悪性腫瘍組織が中心から右に集中しているが他の部分はほぼ正常であるグレースケール像を示す（このことは手術の 1 週間後に病理学的スライドにより確かめられた）。図 11B（中央左）はインドシアニンググリーンの静脈注入の 15 秒後の差分像であり、悪性組織内の最初の数秒における染料流れが正常組織腫瘍内最初の数秒における染料流れ（図 11C 参照）と同様であることを示す。図 11C（左下）は、30 秒後において悪性腫瘍は正常組織に比べて著しく色が濃くなることを示す。図 11D（右上、染料注入の 1 分後）及び図 11E（右下、染料注入の 10 分後）は、良性腫瘍組織と異なり、悪性腫瘍組織では染料が著しく長く保持され、場合によっては悪性腫瘍組織内に長期間に亘って保持されつづける。従って、この装置によれば悪性腫瘍組織を識別し、手術中に正常組織と悪性組織とを区別することができる。種々の等級の腫瘍（例えば正常対良性対悪性）を区別することが出来る。従って、腫瘍組織の位置を撮像しうのみならず、悪性腫瘍は低級腫瘍より長期間染料を保持することから腫瘍を等級付けすることもできる。

#### 例 4

本例は組織が正常に見えるようになるまで悪性 CNS 腫瘍を切除した後の一連の像を示す。腫瘍切除後のこのタイプの撮像は腫瘍切除部のリアルタイム撮像の新規な方法を提供する。切除後に外科医が多数の組織サンプリングを行い、凍結切片の検査結果を待っているあいだに、図 13 に示す像が得られた。図 13 は腫瘍を切除した注目部分の一連の差分像を示す。注目部分には腫瘍が外科的に切除された後は腫瘍組織が無いものと考えた。通常、このサイズの切除部では、単一の凍結サンプルが病理学検査に得られるだけである。この研究のために、組織学を本

、又は（c）像がその全ダイナミックレンジに亘って最大に増強されるまで繰り返す（CCB 利得、黒レベル又は電磁放射源のこれ以上の調整は像を改善しない）。5. ステップ 4 において、（a）利得がその最大レベルにセットされ、又は（b）黒レベルがその最大レベルにセットされたが出力像がまだ最大に増強されていない場合、（a）の場合には CCB のセッティングを僅かに減少させ、電磁放射源強度を明確に丁度飽和するまで増大させる。（b）の場合には、黒レベルのセッティングを僅かに減少させ、電磁放射源強度を増大させ、ステップ 3 に戻る。

#### 例 5

この例は本発明方法および装置が腫瘍組織を全抽出することに関する実時間情報を外科医に提供するように手術室内において設定機能するかどうかを検査するようにした手術中の鼠神経腫瘍モデルを用いる一連の実験を示す。鼠神経腫瘍モデルは標準子鼠モデルであり、最良の像が得られる光学撮像の染料取込み、クリアランスおよび総合パラメータを描くために用いた。このモデルの利点は腫瘍を撮像的に再現可能にするとともに手術用顕微鏡下で腫瘍を抽出し、しかも本発明光学撮像により残留腫瘍を見出す点である。この方法の欠点は腫瘍が一層内腫瘍に見えるとともに人神経腫瘍と比較して血管の大きさが小さいことである。

要するに、鼠神経腫瘍は腎臓悪性星状細胞腫のクローン集団から発生したエチルニトロソウリア誘導 F-344 鼠腫瘍を用いる。この腫瘍は特に人星状細胞腫に顕微鏡的に類似である。その理由は双方が脳実質において星状細胞を有しており、且つ双方が電子顕微鏡の走査により見られるように直径 80-100  $\mu\text{m}$  のイントロサイトプラスミクフィルタを有するからである。神経膠腫細胞は 10% 牛胎児血清が補充されたウエイマウス媒体に保持される。生体細胞（ $5 \times 10^4$ ）は単層培養から抗トリプシン性を破壊するとともに各々が 140-160 g の 30 シンゼネイク鼠の右脳半球内に定位固定的に埋入する。右前頭頭ローブ腫瘍の定位固定座標は前頭葉面に対し 4.5 mm の前葉中央から 3 mm、深さが 6 mm であった。この鼠は埋入時麻酔されていた。頭部は毛を剃り、頭皮を開き、適宜の座標位置に 1 mm の穿頭した。細胞は 27 ゲージ針により注入し、左側に 30 秒後注入を行い、孔を骨ワックスで塞いだ。頭皮を縫合し、この鼠を通常の活動および給餌とるまで 30 日時間観察した。個の鼠は腫瘍埋入後 10-14 日使用した。このモデ

発明で得られるマップと関連させるために線部から 5 つの生検組織を取り出した。図 12A（左上）は腫瘍組織のグレースケール像を示す。図 12B は外科医が脳の上に直接置いたラベルを有する線部を示す。これらのラベルの目的は、本発明装置により差分像を得た後に外科医が組織検査のための病理学サンプルを除去しようとする部分を識別するためである。図 12C（左下）は染料注入の 1 分後の差分像を示し、図 12D（右下）は染料注入の 10 分後の差分像を示す。これらの染料注入後の差分像は腫瘍組織及び正常組織の部分を含む複数の像を示す。光学撮像の精度は病理学的検査により後で確かめた。図 12D の右下の部分は外科医により生検されなかった腫瘍組織の領域を示すことに注意されたい。従って、広範な生検の場合でも、サンプリング誤差が本発明の精度を超える。これらのデータは、本発明は腫瘍の切除後に腫瘍線部の小さな残留腫瘍組織を識別することができることを示す。また、本発明は腫瘍線部のからの生検組織の取り出しを助けるとともに現在使用されているサンプリング技術と関連する固有のサンプリング誤差を低減することができる。

#### 例 5

本例は、全ダイナミックレンジに亘って最大強度を有する信号を検出しようように装置を最適化する CCB のセッティング手段を示す。CPU は次の特徴：（1）出力アナログ信号、明確に近い（即ち 225 に近い）画像値をはっきりした色（例えば赤）で表示する；（2）暗端に近い（即ち 0 に近い）値も青のようなはっきりした色で表示する；を有するソフトウェアでプログラムする。CCD カメラの調整手順の一例は次の通りである。

1. カメラ制御ボックス（CCB）の利得及び黒レベルが 0 に初期設定されている場合、電磁放射源強度を、ビデオ信号が明確に丁度飽和するまで（即ち、出力アナログ像内の幾つかの値が 255 に近似してみえるまで）増大させる。
2. CCB の黒レベルを、出力像が暗端で飽和して見えるようになるまで（即ち、出力アナログ像内の幾つかの値が 0 に近似して見えるまで）増大させる。
3. CCB の利得を、出力アナログ像内の幾つかの値が明確に飽和して見えるまで増大させる。4. ステップ（2）及び（3）を、（a）利得がその最大可能値にセットされるまで、又は（b）黒レベルがその最大可能値にセットされるまで

ルでは、鼠は、活動および給餌増大のような腫瘍注入から 16-18 日後臨床的症狀を開始し、腫瘍膨張によるマウス効果から 19-27 日の間に片側麻痺し、ついに死亡した。

14 匹の鼠によって腫瘍の抽出前および後の像を含む完全な研究を行った。研究のために、鼠は 2% イソフルレンで麻酔し、大脳動脈は染料の導管に用いた。麻酔は  $\alpha$ -クロロラルゾン（50 mg/kg、i.p. 導入）およびウレタン（180 mg/kg、i.p. 導入）により保持した。鼠は定位固定的ホルダに入れた。次いで、頭蓋の除去前（例 7 以下）および後に撮像の研究を行った。腫瘍は前頭半分および右半球の 2/3 を占めた。腫瘍に何ら汚染されていない圧縮された脳は腫瘍包囲として確認され、対側の正常な半球部から腫瘍を分離していた。静脈染料としてインドシアニンググリーンを用いた。導入後脳脊髄液には染料は何ら見いだせなかった。

皮膚表面をまず最初撮像し、次いで、手術用顕微鏡を用いて腫瘍の全抽出を試みた。次に、光学撮像結果に基づき生検用の部位を選定し、その後組織検査を行った。生検試料は 10% パラフォルマルデハイドで固定し、ニッスル染色し、装載した。全ての試料は盲検し、腫瘍に対して正または負のラベルを付した。これらのデータを光学撮像結果と照合して残留腫瘍および結果の有効性を決めるために行う統計解析とを確認した。

撮像装置を以下に述べる。光は直流電源により調整されたタンステン-ハロゲンランプから取出し、ロングパスフィルタ（690 nm）を通過させ、50 または 100 nm 対物レンズを経て反射された直角プリズムを経て皮膚表面に入射させる。反射光は同一の対物レンズにより捕捉され投影レンズにより CCD カメラ（COHU 63000）の表面に集束される。撮像装置は定位固定フレームに設置し、このフレームは耐振動テーブル開口に固定する。空間的に設計された自動ラッピングアルゴリズムによって少量の動きに対する補償を行う。像は 30 Hz で得られ 8 ビット（256 グレイレベル）でデジタル化された。2 秒毎に 30 平均化フレームを真える単一像を得（1 秒）、記憶（1 秒）した。制御像は染料注入前に得、次いで染料注入後 2 分に再び得る。染料注入は 1 秒に亘って行うとともに最後の制御像を記憶する。制御注入間の時間を 20 分として光学像をベースラインに戻すように

する。各試行の初期制御像は互いに差し引いて各試行のベースライン開始点が等しくなるようにする。

単一制御像を選択し、制御像(4-6像)の各々および制御注入後の像の各々から差し引く。かくして得た像は元の制御像により除算し、且つ100倍して染料注入前後の全シーケンスに亘り合成差分像を得るようにする。分離制御像間に生ずるピーク変化は0.1-0.7%であるが、染料注入によるピーク変化は図に示す通りである。像の個別の画素の空間解像度は $13.5 \times 11.7 \mu\text{m}^2$ であった。制御当たりの15-30画素から測定した4角枠を像上に示す。個別の4角枠の平均変化度を計算し、これを用いて種々の型の組織での時間に対する光学変化をグラフ的に示す。

腫瘍研究は14匹の鼠により行った。組織の染料濃度の時間コースはダイナミックなものであった。9匹の鼠の皮膚からの16回の試行のうちの1mg/kgのドーズ量でのインドシアニンググリーン染料濃度による光学画像は光学変化のダイナミック特性を示す。図16は注目領域のグレースケール像を示す。図16Aは注目部位のグレースケール像を示す。これは図14に示す鼠と同一の鼠の像であるが、頭蓋は神経腫瘍を含む左側半球部を露出するために除去するが右側半球部には正常な組織が含まれている。4角枠1は腫瘍上に置き、4角枠2は腫瘍の周囲に置き、4角枠3は正常な組織上に置く。図16Bは1mg/kgのインドシアニンググリーンが鼠に静脈注入した後1秒経過した注目部位の差分像を示す。この初期時間中、腫瘍組織はまず染料の取込みが腫瘍組織に生ずることを表わす測定可能な光学的变化を最初に示す。グレースケールバーは差分像の列の光学的变化の相対的な大きさを示す。図16Cおよび図16Dは染料注入後それぞれ4秒および30秒経過した注目部位の差分像を示す。これらの中間段では染料は正常組織および腫瘍組織の双方に集まる。図16Eおよび図16Fは染料注入後それぞれ1分および5分経過した注目部位の差分像を示す。これら後者の時間では染料は、これが正常組織から清浄になっていくも、いまだ腫瘍組織に集まっていることが明らかである。

ピーク光学変化は染料導入から6秒後に発生したが、正常な半球部が染料をクリアにした後腫瘍組織は染料クリアランスがないため、大きな光学量を保持し続ける。これらの変化は腫瘍箇所に対しては解剖的に局在するものである。

変化の量を示す。図18B、図18Cおよび図18Dは静脈内染料注入後4秒、30秒および60秒経過した腫瘍領域の差分像をそれぞれ示す。微細な生検は好適な染料含有を示す領域からおよび染料が急速にクリアされた領域から採取する。これらの生検は胃解析し、後に生検が採取された箇所と照合する。染料がクリアされた領域から採取した生検は正常な細胞のみが含まれることを示し、染料が滞留した領域から採取した生検は腫瘍細胞のみが含まれることを示す。皮質表面画像に見られる一層迅速な立上がり速度は正常なものと比較して腫瘍に対して正である抽出経路をも示す。腫瘍および正常な脳間の著しい差が立上がり速度、ピーク光学変化および染料注入後60秒経過した台地部に對しても存在する(全て $p < 0.01$ )。図15-18は腫瘍摘出外科手術全体に亘り繰り返し適用し得る染料の多量注入と組合せて本発明方法および装置を適用し得ることを示す(この場合には染料の4回の個別の注入を行う)。さらに、腫瘍領域内の残留腫瘍の極めて小さい島状部をマップすることができる。

光学画像の感度および特別性は34個のサンプル( $n=12$ 匹の鼠)に対して決めることができる。光学画像により腫瘍に対して負であるとみられる15個の生検のうち、14個の生検が組織解析により腫瘍からクリアであった(感度93%)。腫瘍に対して負であった試料の大部分が腫瘍摘出箇所の前壁および深さの箇所からとったものであった(その海馬および変性区をしばしば生検した)。光学画像により腫瘍に対して正であるとみられる19個の生検のうち、17個の生検試料は腫瘍に対して正であった(比率89%)。2つの箇所は組織的には腫瘍に対し負であるが生検的には正であった。その理由は腫瘍組織の病巣が存在しなかったためである。これらの結果のほぼ大部分は $p < 0.001$ である。

図19は腫瘍組織対非腫瘍組織での染料取込みおよびクリアランスのダイナミック情報を示す。これは図18Aから4角枠1および2によって示される空間領域に亘る電磁放射線吸収平均の百分率変化の平均値をプロットして示す。電磁放射線吸収の増大は特定の時間における組織中の染料の濃度の関数である。グラフ“腫瘍組織”は図18Aから得た4角枠1内の吸収変化のダイナミックスをプロットして示し、グラフ“腫瘍正常”は図18Aから得た4角枠2内の吸収変化のダイナミックスをプロットして示す。このデータおよび図19から得たデータは本発明法

光学信号は染料注入後2-3秒内で変化し、全部で3つの部位、腫瘍組織、腫瘍周囲および正常な脳注入後8秒でピークとなる。しかし、3つの異なる組織の型は最初の4秒に亘って上昇してピーク光学変化に到達し、平坦な台部は最初の30秒後に生ずる。腫瘍組織は腫瘍包囲部( $16.4 \pm 6.8\%$ )または正常な脳( $9.7 \pm 4.7\%$ )よりも著しく異なる差分変化度( $40.5 \pm 9.6\%$ )を有する。

図17は図16Aからの4角枠1、2および3によって示される空間領域に亘る電磁放射線吸収平均の変化度の平均値をプロットして示す。吸収の増大は特定時間における組織中の染料濃度の関数である。グラフ“腫瘍組織”は図18Aから得た4角枠2内の吸収変化のダイナミックスをプロットして示し、グラフ“正常な脳”は図18Aから得た4角枠3内の吸収変化のダイナミックスをプロットして示す。このデータおよび図16からのデータは本発明方法および装置が非腫瘍組織から腫瘍のみでなく、腫瘍組織対正常な細胞の可変密度を含む腫瘍部位-包囲部位をも識別し得ることを示す。

ピーク光学変化は染料注入後4-6秒で常時到達するため、腫瘍包囲部または正常な脳と比較して腫瘍組織の光学変化度は著しく迅速であった。腫瘍組織への染料濃度の一層迅速な割合は迅速な時間コースとして表示する。腫瘍組織の立上がり時間は腫瘍包囲部および正常な脳よりも一層迅速且つ大きかった( $p < 0.01$ )。14匹のうちの13匹の鼠では、正常な組織および腫瘍包囲部がベースラインに戻った後の腫瘍の光学信号が大きく増大( $> 2$ 分)した。最後に正常な組織および腫瘍包囲部も染料取込みが著しく相違した(立上がり時間、正常2.4%/秒、腫瘍包囲部4.0%/秒)。従って正常な取込みおよびクリアランスのダイナミックな特性は切除経路を画像化する際に含まれる組織の型を決定するのが極めてとなる。

この鼠神経腫瘍モデルはすべての可視腫瘍が除去されると、抽出経路を画像する機会が得られることである。図18は切除された腫瘍組織の腫瘍細胞の残留痕跡を表わす染料取込みのダイナミック像を示す。これは図14-17に示す同一の鼠での研究の継続である。図18Aは腫瘍が切除された後の鼠の左側半球部の高倍大像を示す。4角枠1は残留腫瘍細胞の僅かな痕跡を含む領域上にあり、4角枠2は正常な組織のみを含む領域上に位置する。グレースケールバーは差分像の光学的

置および方法によって極めて高い空間および時間解像度で腫瘍領域内では非腫瘍組織から腫瘍組織を識別し得ることを示す。

#### 例 7

この例は本発明方法および装置が外科手術前後無損傷頭蓋を経て画像し得るかどうかを検査する鼠神経腫瘍を用いる一連の実験を示す。電磁放射線の遠赤外波長が骨および皮膚を経て透過することは既知である。腫瘍組織の腫瘍を鼠の無損傷頭蓋を経て行った。腫瘍確認度は皮質を露出する場合よりも精確ではなかった。しかし、腫瘍組織を有する頭蓋の下側の部位は容易に確認し、局限化し、数分後染料を濃縮し続けた。最初染料注入後腫瘍部位を対向側の半球部の正常な脳よりも大きな信号を示した。染料注入後1分して染料は正常な脳からクリアとなり、残留信号は腫瘍組織内に予午線/垂直線に残留した。

図14は本発明を用いて無損傷頭蓋による腫瘍を確認し得ることを示す。図14Aは鼠の頭蓋表面のグレースケール像である。縦結合は鼠の中央を走っている。腫瘍細胞が数日前に左側に注入され、従ってこの鼠はその脳の左側半球部に神経腫瘍が発生する。右側半球部は正常である。4角枠1は鼠の腫瘍の発生領域上に置き、4角枠2は正常な組織上に置く。図14Bはインドシアニンググリーン染料が鼠に手術中に注入された後1秒経過した差分像である。腫瘍組織を含む領域は無損傷頭蓋を経て直ちに見え得るようになる。図14Cは染料注入後5秒で染料が正常な組織および腫瘍組織に充満していることを見る可以看到。図14Dは、染料注入後1分経過して正常な組織が染料を清浄にするが、染料は腫瘍領域にまだ保持されている。この差分像中心の染料の濃度は緩慢で循環する染料である。

4匹の鼠で10回頭蓋を経て画像された光学変化の時間コースを図15に示す。この光学変化は腫瘍上および正常な半球部上に直接照射した4角枠内の平均光学変化によって決める。吸収の増大は特定時間における組織の染料の濃度の関数である。グラフ“頭蓋腫瘍”は図14Aから4角枠1内の吸収変化のダイナミックスをプロットして示す。グラフ“頭蓋正常”は図14Aから4角枠2内の吸収変化のダイナミックスをプロットして示す。頭蓋を経て画像された腫瘍のピーク光学変化は $13.1 \pm 3.9\%$ であり、正常な脳( $7.8 \pm 2.3\%$ )と比較して著しく大きい( $p < 0.01$ )。染料注入後60秒経過した台地部は腫瘍組織( $40.5 \pm 9.6\%$ )が正常な脳

## 特表平7-507472 (18)

(3.1 ± 0.7) と比較して著しく大きかった

### 例 8

この例は体節神経を刺激して知覚皮質を活性化させるネズミのモデルを示す。特に、座骨神経を直接刺激することにより麻酔をかけたネズミに求心性の知覚入力を発生させた。図5の最も左側の像は麻酔をかけたネズミの後脚知覚皮質のグレイスケール像である。筋率は個々の毛細血管を区別し得るようになる(この像では最も小さい血管を見ることができる)十分高くする。中央の像は安静中に光学像の制調整の割合を変えた像である。この光学的変化の大きさをこの像の中央にグレイスケールバーで示してある。このグレイスケールの横の矢印は振幅が増大する方向を示している。右側の像は座骨神経の刺激中の後脚知覚皮質における光学的変化の割合を変えたマップである。従って、本発明による装置及び方法を利用して、被検体の種々の部位に相当する皮質の機能部位をマップすることができる。

### 例 9

この例は染料の取込み及び保存に係わる差分ダイナミックにより、慣例のMRI画像でのコントラストの増強を図らない人間の患者における腫瘍組織を特徴付け、且つ識別し得ることを示す。撮像技法では非血管性腫瘍部分を観察することはできない。図13の像は患者の腫瘍をMRIでコントラストの増強をはからなかったものである。このようにコントラストを増強しないことは良性腫瘍では普通である。しかし、光学的撮像は所る腫瘍を非血管性タイプのもの(紅門状腫瘍組織)として識別することができた。図13Aは注目部位のグレイスケール像を示す。図13Bは染料注入前の差分像を示す。図13Cは静脈に染料を注入してから1分後の注目部位を示し、図13Dは染料を注入してから5分後の注目部位を示す。なお、染料はかなり長い時間組織内に保存される。図10、図11及び図12に示すように、このようなダイナミックな特性は非血管性腫瘍の特徴である。

### 例 10

この例では末梢神経の機能部位を特徴した。ネズミに麻酔をかけて解剖して座骨神経を露出させた。銀の電極を用いて座骨神経の末端を電気的に刺激しながら第1シーケンスの差分像を得た。刺激によるピーク光学変化を含む種々の像を調

べることにより、神経の刺激箇所から内在光学的变化が広がることが判った。次に刺激電極の前方の近い距離にて神経をクラッシュさせた。次いで第2シーケンスの差分像を得て、このシーケンスからの対応する差分像と第1シーケンスの差分像からのピーク光学変化を含んでいる像とを比較した。この結果、神経を破壊した箇所では本来の光学的变化が急激に減少することが判った。

最後に、クラッシュさせる箇所の前方の神経を刺激して、内在光学的变化が急激に終了することを再び確かめた。この方法によって破壊又は損傷末梢神経組織の位置及び大きさを局所化することができる。

### 例 11

この例は頭蓋神経の機能部位の像を示す。頭蓋神経第Ⅴ(前庭蝸牛神経)を露出させる。音は最終的にこの神経を活動させる聴覚刺激を与える。適当な聴覚刺激が与えられる前と、その最中と、その後の差分像のシーケンスは、神経の内在光学的变化がこの神経の機能的活動性に関連することを示した。次に、この神経の少量部位をクラッシュにより破壊させた。第2シーケンスの像は、聴覚刺激が神経の破壊箇所までその神経の内在光学変化を喚起させることを示した。

### 例 12

この例は多重波長及び/又はレーザ照射を用いて腫瘍組織から得た像、即ち内在信号による差分像を増強する様々な方法及び多重波長を用いて3次元情報を抽出する方法を示す。麻酔をかけたネズミの皮質部位を露出させた。まず、タングステンフィラメントランプからの白色光を照射して、双極刺激電極で皮質のこの部位を電気的に刺激する前と、その最中と、その後における第1シーケンスの差分像を得た。その次に、皮質を690nmの光で照射して第2シーケンスの差分像を得、その後510nmの光で照射して第3シーケンスの差分像を得た。この波長の波長は、光源と検出との間に690 ± 10nmの干渉フィルタ又は510 ± 10nmの干渉フィルタを置くことによって行った。

まず690nm像を510nm像と比較することによりコントラスト増強像を計算した。次に、刺激中の690nm像を対応する510nm像と比較した。次いで、これらの比較像を合成して百分率の差分像を形成した。この方法では雑音が著しく低減され、従って信号/雑音比は著しく増大した。

次に、取得した多重波長像からの深度情報の抽出の仕方につき説明する。

光の波長が長くなるにつれて、皮質への侵入深さは大きくなり、光の波長が短くなるにつれて皮質への侵入深さは浅くなる。従って、690nm像は光が皮質にxmmまで侵入した像であり、510nm像はymmまで侵入した像であり、ここにx < yである。

510nm像から690nm像を差引くことにより、皮質組織内の(x-y)mmからxmmまでの深度からの情報を含んでいる「光学くさび」が得られる。他の一連の干渉フィルタを用いることによって、皮質の多くの異なる深度からの情報を含んでいる像のシーケンスを得た。こうして3次元情報を得ることができる。

次に、腫瘍成長させたネズミの腫瘍組織を露出させて、上述したすべての実験を繰返して、同様に信号/雑音比を改善し、且つ腫瘍組織における3次元情報を抽出し得ることを確かめた。しかし、この場合には組織を電気的に刺激する代わりに、インドシアニングリーン又はエバンスブルーの色素を染料として注入した。

最後に非コヒーレントのタングステンフィラメントランプの代わりに、染料同調可能なレーザ(コヒーレント光源)を用いて種々の波長で皮質を照射することにより上記実験を繰返した。レーザ(又は任意のコヒーレント光源)では、反射又は散乱での変化による信号成分を区別し得るという追加の利点を得られる。皮質をレーザでカメラと平行に直接照射する(レーザ及びカメラは頭部に垂直とする)ことにより、反射光だけで撮像する。レーザをカメラに対して角度θ動かすことによって、この特定角度での散乱光だけによる変化を測定した。

### 例 13

この例は一対の像をx-y平面における変換での制像像による最適なものに自動的に変換するための本発明によるアルゴリズム及び戦略を実施するCコードを示す。本発明による装置が順次取得される像を制像像に自動的に変換して、手術室内で動きをオンライン式に補償するようにアルゴリズムを実施することができる。なお、このアルゴリズムを整数演算で行なうことができるため、計算上有効であることは明らかである。又、このアルゴリズムに必要とされる殆どのメモリを動的に割り振ることができるから、このアルゴリズムはメモリを有効に使用する。

所るプログラムは撮像技法151フレームバッファに格納された2つの像を最適なものに自動的に変換し、これによりユーザが選択した注目部位における減算像の不一致が最小となる。ユーザはフレームバッファB1用の像を特定化し、次いでB1像に自動的に変換すべきフレームバッファLOW用の像を特定化する。注目部位の数が9個以下で、しかも探索深度が8以下の場合には、全データをフレームバッファからホストコンピュータのRAMに読み込むことができる。こうして、動作速度を向上させ、フレームバッファへの1/0を減らすことができる。このプログラムは全ての計算に整数演算だけを使用するように簡単に変えることができる。

このプログラムは撮像技法のITEXランタイムライブラリにリンクさせたマイクロソフト社のC/C++バージョン7.0コンパイラでコンパイルすることができる。プログラムの実行は、撮像技法のITEX151シリーズのハードウェアから1kx1kフレームバッファ、AD1及びALUを制御するPC486コンパチブルホストコンピュータで行なう。



```

.....
#include <stdio.h>
#include <math.h>
#include <stdlib.h>
#include <conio.h>
#include <fcntl.h>
#include <graph.h>
#include <float.h>
#include <dos.h>
#define MEM_CHUNK 20
#define QUIT -1
#define GO -2
#define RADDX_10 10
#define RETURN 13
#define ESC 27
#define CURSOR_UP 72
#define CURSOR_DOWN 80
#define CURSOR_RIGHT 77
#define CURSOR_LEFT 75
#define CURSOR_JUMP_UP 143
#define CURSOR_JUMP_DOWN 145
#define CURSOR_JUMP_RIGHT 116
#define CURSOR_JUMP_LEFT 115
struct data_box{
    int x, y;
    int height, width;
};
typedef struct data_box data_box;
int box_count = 0;
int depth = 10;
void init_box_overlay(void);
BYTE **ram_boxdata(data_box **map_ptr, int search_depth, int frame_buffer);
data_box **define_boxmap(void);
data_box **draw_boxes(void);
BYTE **diff_box(data_box **map_ptr, BYTE **fb1, BYTE **fb2,
    int box_count, int x_off, int y_off);
float sub_rects(data_box **map_ptr, BYTE **diff_rects, int search_depth,
    int ptr_place);
BYTE **diff_map(data_box **map_ptr, int fb1, int fb2, int search_depth);
float *sum_rects(data_box **map_ptr, BYTE **diff_rects, int search_depth,
    int av_flag);
int *min_boxes(data_box **map_ptr, float *float_ptr, int search_depth);
float *var_rects(data_box **map_ptr, BYTE **diff_rects, int search_depth,
    int av_flag);
data_box **define_boxmap(void) /* returns a pointer to an array of boxes */

int i = 0, maxbox = MEM_CHUNK; /* dynamically allocate mem in 20-box */
int error_flag = 0, inchar; /* chunks */
data_box **group_of_boxes;
data_box *box_pointer;
int watch = GO;
box_pointer = (data_box *)malloc(maxbox*sizeof(data_box));
if(box_pointer == NULL)

```

```

int curs_x = 235, curs_y = 220;
data_box **draw_boxes(void)
{
    int dcurs_x, dcurs_y;
    int x_start, y_start, x_length, y_length;
    int text_char;
    char box_number[3];
    data_box *box_pointer;
    box_pointer = (data_box *)malloc(sizeof(data_box));
    if(box_pointer == NULL)
        printf("TROUBLE AT 131\n");
    line(B2,0,curs_x-4,curs_y,curs_x+4,curs_y,1);
    line(B2,0,curs_x-5,curs_x,curs_y+5,1);
    adi_lumode(DYNAMIC);
    k = 0;
    x_start = y_start = x_length = y_length = 0;
    while(1) {
        text_char = getch();
        if(text_char == RETURN) {
            ++k;
            dcurs_y = 0;
            dcurs_x = 0;
            if(k == 1) {
                x_start = curs_x;
                y_start = curs_y;
                line(B2,0,curs_x-4,curs_y,curs_x+4,curs_y,0);
                line(B2,0,curs_x,curs_y-5,curs_x,curs_y+5,0);
            }
            if(k == 2)
                break;
        }
        else if(text_char == 0) {
            text_char = getch();
            switch(text_char) {
                case CURSOR_UP:
                    dcurs_y--;
                    dcurs_x = 0;
                    break;
                case CURSOR_DOWN:
                    dcurs_y++;
                    dcurs_x = 0;
                    break;
                case CURSOR_LEFT:
                    dcurs_y = 0;
                    dcurs_x--;
                    break;
            }
        }
    }
}

```

```

printf("TROUBLE AT 70\n");
group_of_boxes = (data_box **)malloc(maxbox*sizeof(data_box));
if(group_of_boxes == NULL)
    printf("TROUBLE AT 74\n"); /* FLAG 1 !!! */
else {
    while(watch != QUIT) {
        if(error_flag == 0) {
            printf("\nType ESC use draw_boxes\n");
            inchar = getch();
            if(inchar == 0)
                getch();
            if(ESC == inchar) {
                box_count = 1;
                init_box_overlay();
                while(watch != QUIT) {
                    if(i >= maxbox) {
                        maxbox += MEM_CHUNK;
                        group_of_boxes = (data_box **)realloc(group_of_boxes,
                            maxbox*sizeof(data_box));
                        if(group_of_boxes == NULL)
                            printf("TROUBLE AT 91\n"); /* FLAG 2 !!! */
                    }
                    group_of_boxes[i++] = draw_boxes();
                    printf("Do you want to draw box number %d ?\n",
                        (box_count + 1));
                    inchar = getch();
                    if(inchar == 0)
                        getch();
                    if(inchar == ESC)
                        box_count++;
                    else
                        watch = QUIT;
                }
            }
        }
        if(i < maxbox) {
            group_of_boxes = (data_box **)realloc(group_of_boxes,
                (i+1)*sizeof(data_box));
            if(group_of_boxes == NULL)
                printf("TROUBLE AT 113\n"); /* FLAG 3 !!! */
            return(group_of_boxes);
        }
    }
}

```

ボックス ( ) は IT EX 151 ADI オペレータ キーバリティのオペレータ キーバリティを用いて示すためのユーザ用の図の1枚を示す図である。その主な図は、近接された注目領域の位置及び領域に関する情報を各ボックス構造にポイントすることにある。

```

case CURSOR_RIGHT:
    dcurs_y = 0;
    dcurs_x++;
    break;
case CURSOR_JUMP_UP:
    dcurs_y = -7;
    dcurs_x = 0;
    break;
case CURSOR_JUMP_DOWN:
    dcurs_y = 7;
    dcurs_x = 0;
    break;
case CURSOR_JUMP_LEFT:
    dcurs_y = 0;
    dcurs_x = -7;
    break;
case CURSOR_JUMP_RIGHT:
    dcurs_y = 0;
    dcurs_x = 7;
    break;
default:
    dcurs_x = 0;
    dcurs_y = 0;
    break;
}
else
    text_char = -1;
if((k == 0) && (text_char != -1)) {
    line(B2,0,curs_x-4,curs_y,curs_x+4,curs_y,0);
    line(B2,0,curs_x,curs_y-5,curs_x,curs_y+5,0);
    curs_x = max(min(curs_x+dcurs_x,511),0);
    curs_y = max(min(curs_y+dcurs_y,479),0);
    line(B2,0,curs_x-4,curs_y,curs_x+4,curs_y,1);
    line(B2,0,curs_x,curs_y-5,curs_x,curs_y+5,1);
}
else if(k == 1) {
    line(B2,0,x_start,y_start,x_start+x_length,y_start,0);
    line(B2,0,x_start,y_start,x_start+y_length,0);
    line(B2,0,x_start,y_start+y_length,x_start+x_length,y_start+y_length,0);
    curs_x = max(min(curs_x+dcurs_x,511),0);
    curs_y = max(min(curs_y+dcurs_y,479),0);
    x_length = curs_x - x_start;
    y_length = curs_y - y_start;
    line(B2,0,x_start,y_start,x_start+x_length,y_start,1);
    line(B2,0,x_start,y_start,x_start+y_length,y_start+y_length,1);
}

```

```

line(B2,0,x_start,y_start+y_length,x_start+
      x_length,y_start+y_length,1);
line(B2,0,x_start+x_length,y_start+y_length,
      x_length,y_start+y_length,1);
}
}
x_start = min(x_start,x_start+x_length);
y_start = min(y_start,y_start+y_length);
x_length = abs(x_length);
y_length = abs(y_length);
if(box_count < box_number,RADIX_10);
if((x_length < 10) || (y_length < 10)) {
    if(x_length > y_length)
        text(B2,0,x_start+x_length/2-7,y_start-15,
              HORIZONTAL,1,1,box_number);
    else{
        if(box_count < 10)
            text(B2,0,x_start-11,y_start+y_length/2-2,
                  HORIZONTAL,1,1,box_number);
        else
            text(B2,0,x_start-18,y_start+y_length/2-2,
                  HORIZONTAL,1,1,box_number);
    }
}
else
    text(B2,0,x_start+x_length/2-5,y_start+y_length/2-2,
          HORIZONTAL,1,1,box_number);
box_pointer->x = x_start; /* x coordinate */
box_pointer->y = y_start; /* y coordinate */
box_pointer->height = y_length; /* vertical length */
box_pointer->width = x_length; /* horizontal length */
curr_x+=20; /* move cross-hairs to nearby location */
curr_y+=20;
return box_pointer;
}
void init_box_overlay(void)
{
    /* Clear B2, set path to B1, and overlay */
    fb_setmask(FRAMEB,0x00FF); /* B2 on B1 */
    fb_clr(B2,0);
    select_path(B1);
    adi_hblanked(1);
    adi_hgroupsel(RED);
    adi_clearlut(250);
    adi_hgroupsel(GREEN);
    adi_clearlut(0);
    adi_hgroupsel(BLUE);
    adi_clearlut(0);
}
void init_jtex_stuff(void)

```

```

if(box == NULL)
    printf("\nScrewed at line 341\n");
for(i=0;i<x_length;i++){
    box[i] = (BYTE *)malloc(sizeof(BYTE)*y_length);
    if(box[i] == NULL)
        printf("\nScrewed at 342\n");
    for(j=0;j<y_length;j++){
        box[i][j] = (BYTE)(abs((int)(fb_ptr1[i+count1][j]) -
                                   (int)(fb_ptr2[i+x_off+count2][j+y_off])));
    }
}
return(box);
}
BYTE ***diff_map(data_box **map_ptr,int fb1,int fb2,int search_depth){
    BYTE ***diff_rects,data_box **fb1_ptr,**fb2_ptr;
    int count=0;
    int i,j,k,l;
    unsigned int size,total_size=box_count*(2*search_depth+1)*
                                   (2*search_depth+1);
    size = 2*search_depth+1;
    diff_rects = (BYTE ***)malloc(sizeof(BYTE **)*total_size);
    if(diff_rects == NULL)
        printf("\nScrewed at 379\n");
    fb1_ptr = ram_boxdata(map_ptr,0,fb1);
    fb2_ptr = ram_boxdata(map_ptr,search_depth,fb2);
    for(i=0;i<box_count;i++){
        for(j=0;j<size;j++){
            for(k=0;k<size;k++){
                diff_rects[count] = diff_box(map_ptr,fb1_ptr,fb2_ptr,i,j,k);
                count++;
            }
        }
    }
    return(diff_rects);
}
float *sum_rects(data_box **map_ptr,BYTE ***diff_rects,int search_depth,
                  int av_flag){
    unsigned int i,j,k,l,m,count=0;
    float size = (2*search_depth+1);
    float total_size = (2*search_depth+1)*(2*search_depth+1)*box_count;
    float *sum_ptr;
    sum_ptr = (float *)calloc((unsigned int)total_size,sizeof(float));
    if(sum_ptr == NULL)
        printf("\nSCREWUP AT 537\n");
    for(i=0;i<box_count;i++){
        for(j=0;j<size;j++){
            for(k=0;k<size;k++){
                for(l=0;l<(*map_ptr[i]).width;l++){
                    for(m=0;m<(*map_ptr[i]).height;m++){
                        sum_ptr[count] += diff_rects[count][l][m];
                        if(av_flag == ON)
                            sum_ptr[count] = sum_ptr[count]/

```

```

err_level(2);
load_cfg("");
init_sys();
BYTE **ram_boxdata(data_box **map_ptr,int search_depth,int frame_buffer){
    int i,j,k,x_start,x_end,x_length,y_start,y_length;
    BYTE **image_rects;
    unsigned int count=0;
    unsigned int total_length=0;
    select_path(frame_buffer);
    for(i=0;i<box_count;i++){
        total_length += (*map_ptr[i]).width + 2*search_depth;
        image_rects = (BYTE **)malloc(total_length*sizeof(BYTE *));
        if(image_rects == NULL)
            printf("\n409a\n");
        for(i=0;i<box_count;i++){
            x_start = (*map_ptr[i]).x - search_depth;
            x_end = (*map_ptr[i]).x + search_depth + (*map_ptr[i]).width;
            x_length = (*map_ptr[i]).width + 2*search_depth;
            y_start = (*map_ptr[i]).y - search_depth;
            y_length = (*map_ptr[i]).height + 2*search_depth;
            for(j=x_start;j<x_end;j++){
                image_rects[count] = (BYTE *)malloc(sizeof(BYTE)*y_length);
                if(image_rects[count] == NULL)
                    printf("\nSCREWUP 420a\n");
                fb_rvline(B1,j,y_start,y_length,image_rects[count]);
                count++;
            }
        }
    }
    return(image_rects);
}
BYTE **diff_box(data_box **map_ptr,BYTE **fb_ptr1,BYTE **fb_ptr2,
                 int box_number,int x_off,int y_off){
    unsigned int x_length,y_length;
    static unsigned int count1=0,count2=0;
    int i,j;
    static int old_number;
    BYTE **box;
    x_length = (*map_ptr[box_number]).width;
    y_length = (*map_ptr[box_number]).height;
    if(box_number == 0)
        old_number = 0;
    if(old_number != box_number){
        count1 += x_length;
        count2 += x_length + 2*depth;
        old_number = box_number;
    }
    box = (BYTE **)malloc(sizeof(BYTE *)*x_length);
    count++;
    (*map_ptr[i]).width * (*map_ptr[i]).height);
    count++;
    return(sum_ptr);
}
float *var_rects(data_box **map_ptr,BYTE ***diff_rects,int search_depth,
                  int av_flag){
    unsigned int i,j,k,l,m,count=0;
    float size = (2*search_depth+1);
    float total_size = (2*search_depth+1)*(2*search_depth+1)*box_count;
    float *var_ptr,*av_ptr;
    av_ptr = sum_rects(map_ptr,diff_rects,search_depth,av_flag);
    var_ptr = (float *)calloc((unsigned int)total_size,sizeof(float));
    if(var_ptr == NULL)
        printf("\nTrouble at 477\n");
    for(i=0;i<box_count;i++){
        for(j=0;j<size;j++){
            for(k=0;k<size;k++){
                for(l=0;l<(*map_ptr[i]).width;l++){
                    for(m=0;m<(*map_ptr[i]).height;m++){
                        var_ptr[count] += ((float)(diff_rects[count][l][m])
                                           - av_ptr[count]);
                        count++;
                    }
                }
            }
        }
    }
    free(av_ptr);
    return(var_ptr);
}
int *min_boxset(data_box **map_ptr,float *float_ptr,int search_depth){
    unsigned int i,j,box_jump;
    float metric,min_metric = FLT_MAX,position=0;
    int shift[3];
    div_t div_result;
    box_jump = (2*search_depth+1)*(2*search_depth+1);
    for(i=0;i<box_jump;i++){
        metric = 0;
        for(j=0;j<box_count;j++){
            metric += float_ptr[j]*box_jump + j;
            if(metric < min_metric){
                min_metric = metric;
                position = i;
            }
        }
    }
    div_result = div((int)position,(int)(2*search_depth+1));
    shift[0] = (int)position;
    shift[1] = depth - div_result.quot;
    shift[2] = depth - div_result.rem;
    return(shift);
}

```

```
int main(void)
{
    BYTE ***mock_pointer;
    char image[12];
    data_box **map_pointer;
    int *stat_ptr;
    float *sum_ptr;
    int *trans;
    int *tex_stuff;
    float init;
    _clearscreen( _GCLEARSCREEN );
    _settextposition( 10, 10);
    select_path(B1);
    _outtext("BASE Image : ");
    scanf("%s", image);
    im_read(B1,0,0,512,480,image);
    _settextposition( 15, 10);
    select_path(ALOW);
    _outtext("Image to translate : ");
    scanf("%s", image);
    im_read(ALOW,0,0,512,480,image);
    _settextposition(20,20);
    _outtext("Search depth : ");
    scanf("%d", &depth);
    select_path(B1);
    map_pointer = define_boxmap();
    sum_ptr = var_rects(map_pointer, mock_pointer, depth, ON);
    trans = min_boxset(map_pointer, sum_ptr, depth);
    printf("VARIANCE : pos = %d, x_trans = %d, y_trans = %d\n",
        trans[0], trans[1], trans[2]);
    free(mock_pointer);
    free(sum_ptr);
    free(trans);
    return 0; }

```

FIGURE 1B

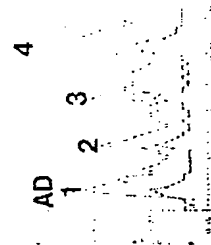


FIGURE 1A



FIGURE 1D

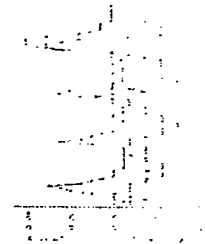


FIGURE 1C



FIGURE 2C2



FIGURE 2B2



FIGURE 2A2



FIGURE 2C4



FIGURE 2B4



FIGURE 2A4



FIGURE 3D



FIGURE 3C



FIGURE 3B



FIGURE 3A

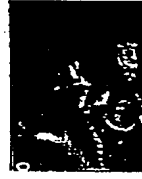


FIGURE 3H



FIGURE 3G



FIGURE 3F



FIGURE 3E



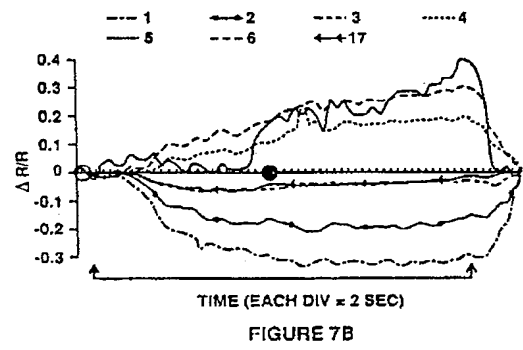
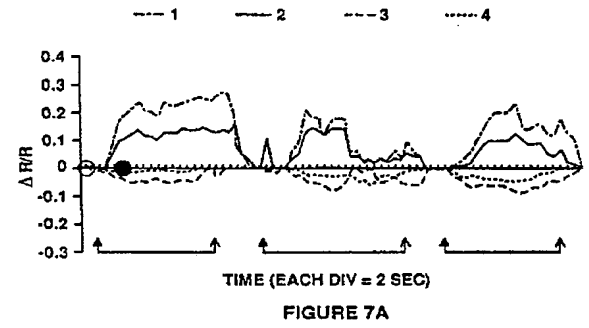
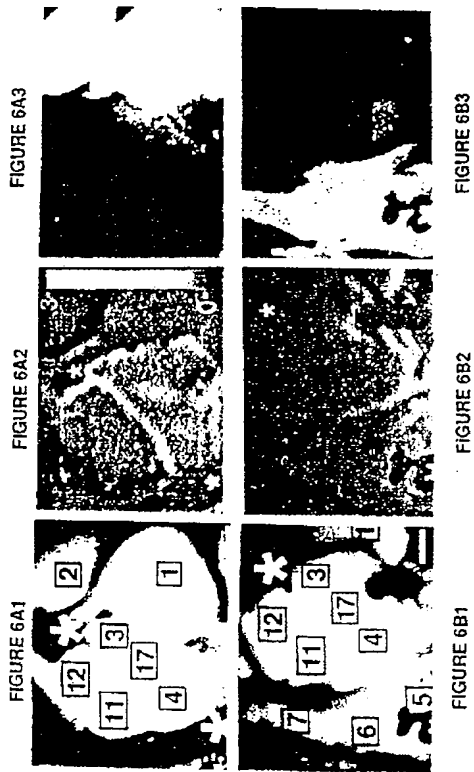
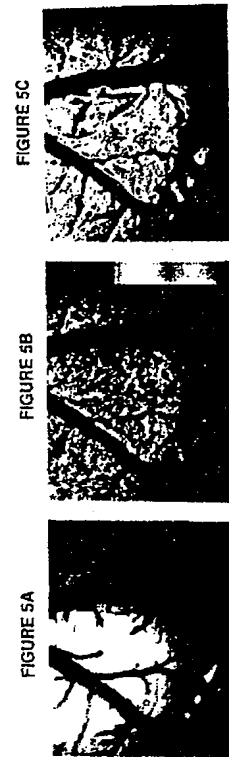
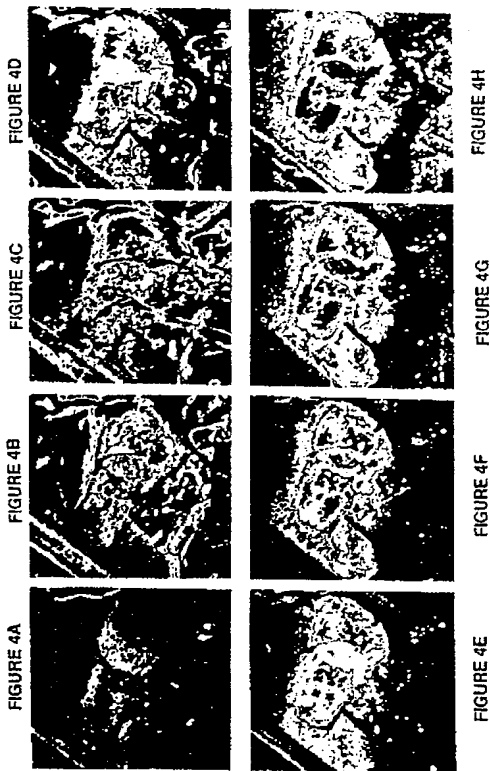


FIGURE 8A

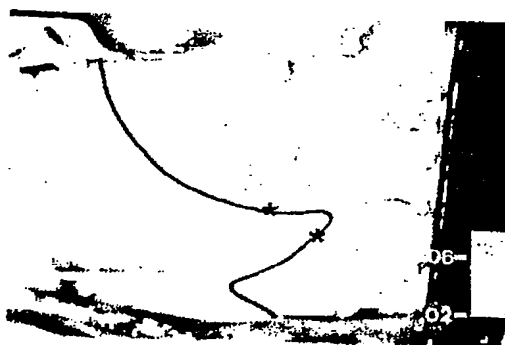
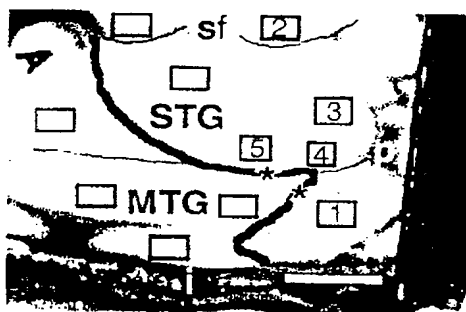


FIGURE 8B

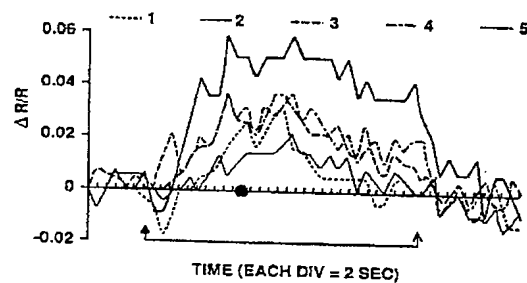


FIGURE 9A

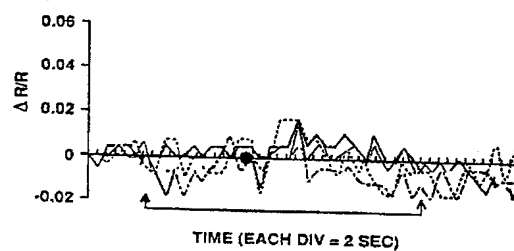


FIGURE 9B

FIGURE 10A

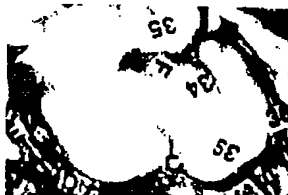


FIGURE 10D



FIGURE 10B



FIGURE 10E



FIGURE 10C



FIGURE 10F



FIGURE 11A



FIGURE 11D



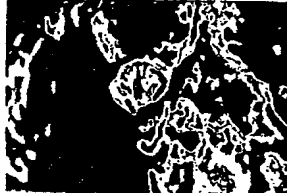
FIGURE 11B

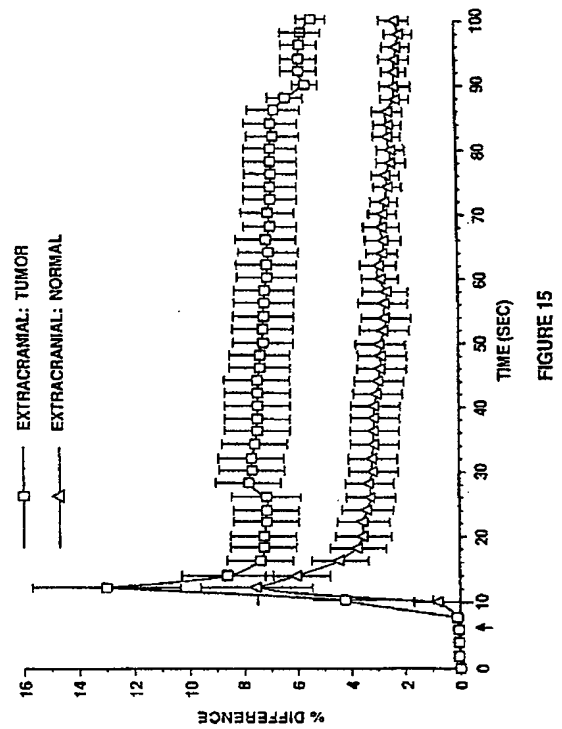
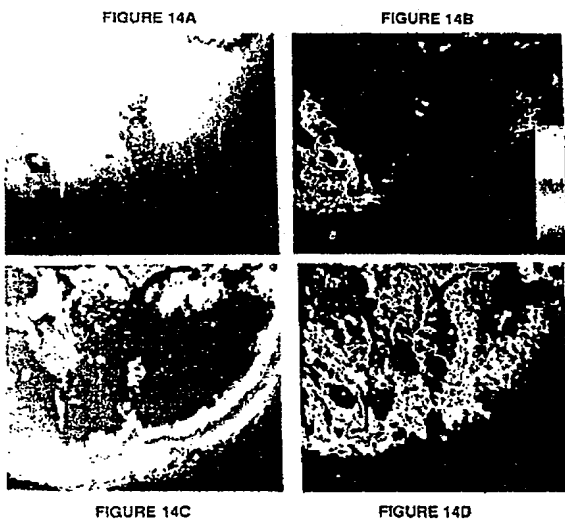
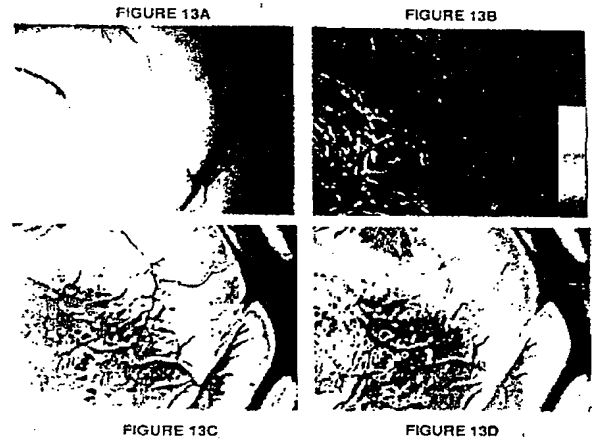
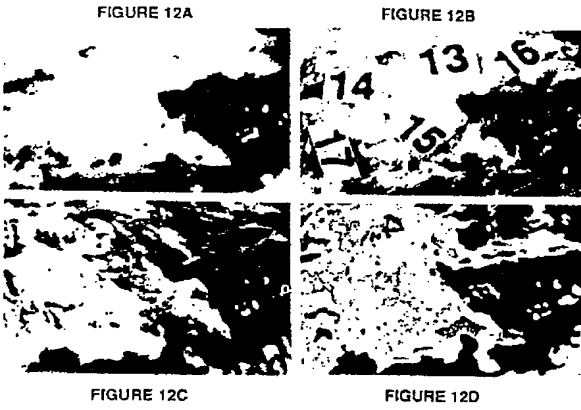


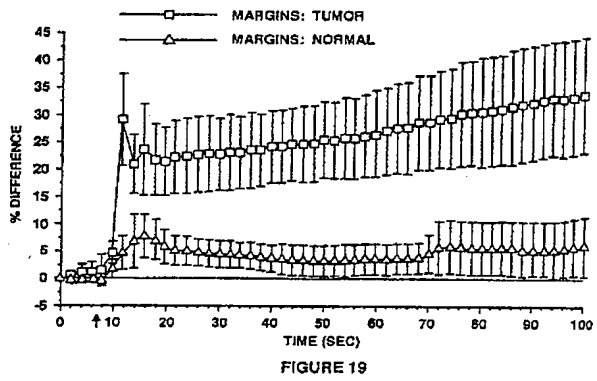
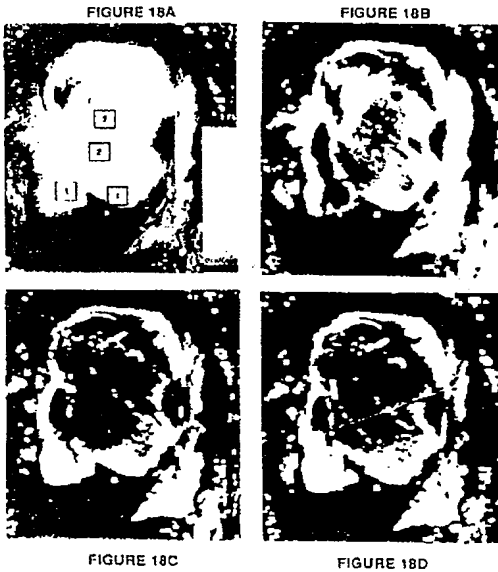
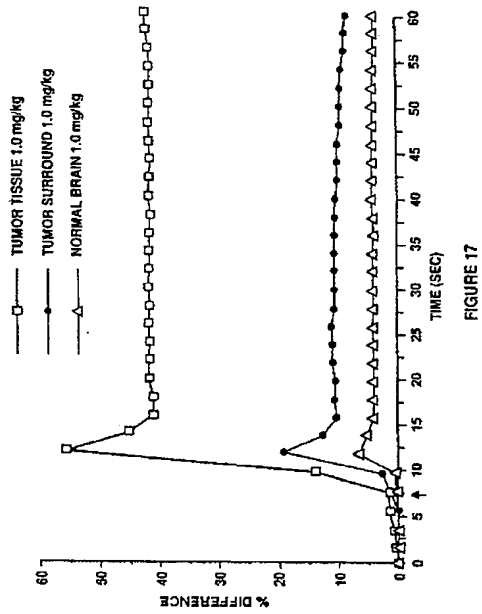
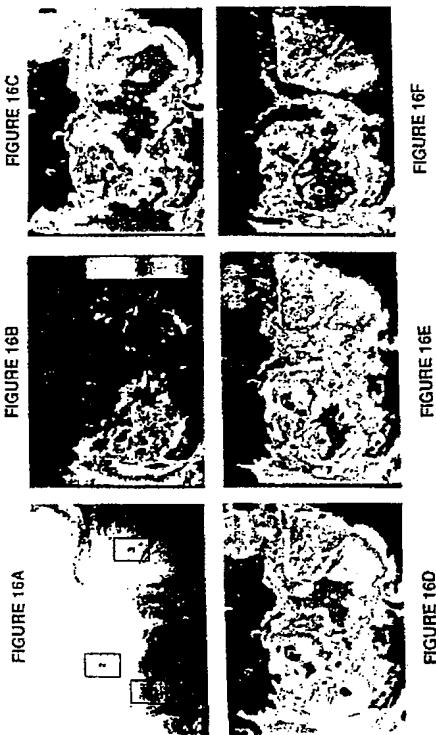
FIGURE 11E



FIGURE 11C







國際調查報告		International application No. PCT/US93/0377
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
(IPC) : A61B 5/00		
US CL. : 128/433; 1,633,604,065; 358/110,113; 364/412,113		
According to International Patent Classification (IPC) or to each national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Invention documents searched (classification system, followed by classification symbols)		
U.S. : 128/433; 1,633,604,065; 358/110,113; 359/110,113; 364/412,113; 363/06		
Documents searched other than invention documents in the extent that such documents are included in the fields searched		
Documents data have been searched during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US.A. 5,027,817 (JOHN), 02 JULY 1991, SEE ENTIRE DOCUMENT.	1,3,7,8
Y		2,12,13
X,P	US.A. 5,198,977 (SALB), 30 MARCH 1993, SEE ENTIRE DOCUMENT.	4-10,14-16
Y	US.A. 4,515,185 (CARROLL), 07 MAY 1985.	12,13
A,P	US.A. 5,213,105 (GRATTON ET AL), 25 MAY 1993.	1-15
A	US.A. 5,014,709 (BJELKHAGEN ET AL), 14 MAY 1991.	1-15
A	US.A. 4,999,614 (UEDA ET AL), 12 MARCH 1991.	1-15
A	US.A. 4,768,513 (SUZUKI), 06 SEPTEMBER 1988.	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Sec. E. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
*A* Invention documents of the international search report which are not included in the list of documents referred to in the international search report. *B* Documents published on or after the international filing date. *C* Documents which have been deemed to be prior art by the international search authority. *D* Documents which have been deemed to be prior art by the international search authority. *E* Documents which have been deemed to be prior art by the international search authority. *F* Documents which have been deemed to be prior art by the international search authority. *G* Documents which have been deemed to be prior art by the international search authority. *H* Documents which have been deemed to be prior art by the international search authority. *I* Documents which have been deemed to be prior art by the international search authority. *J* Documents which have been deemed to be prior art by the international search authority. *K* Documents which have been deemed to be prior art by the international search authority. *L* Documents which have been deemed to be prior art by the international search authority. *M* Documents which have been deemed to be prior art by the international search authority. *N* Documents which have been deemed to be prior art by the international search authority. *O* Documents which have been deemed to be prior art by the international search authority. *P* Documents which have been deemed to be prior art by the international search authority. *Q* Documents which have been deemed to be prior art by the international search authority. *R* Documents which have been deemed to be prior art by the international search authority. *S* Documents which have been deemed to be prior art by the international search authority. *T* Documents which have been deemed to be prior art by the international search authority. *U* Documents which have been deemed to be prior art by the international search authority. *V* Documents which have been deemed to be prior art by the international search authority. *W* Documents which have been deemed to be prior art by the international search authority. *X* Documents which have been deemed to be prior art by the international search authority. *Y* Documents which have been deemed to be prior art by the international search authority. *Z* Documents which have been deemed to be prior art by the international search authority.		
Date of the report on completion of the international search		Date of mailing of the international search report
07 SEPTEMBER 1993		20 OCT 1993
Name and mailing address of the ISA/US Component of the ISA/US Box PCT Washington, D.C. 20541		Authorized officer KRISTA WAPPLE
Examination No. NOT APPLICABLE		Telephone No. (703) 305-6155
Form PCT/ISA/210 (revised January 1992)		

國際調查報告		International application No. PCT/US93/0377
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US.A. 4,767,717 (BAISDEN), 30 AUGUST 1988.	1-15
A	US.A. 4,556,057 (HIRUMA ET AL), 03 DECEMBER 1985.	1-15
Form PCT/ISA/210 (continuation of record sheet July 1992)		



[54] **SOLID TUMOR, CORTICAL FUNCTION, AND NERVE TISSUE IMAGING METHODS AND DEVICE**

[76] Inventors: **Darryl Hochman**, 22933 Edmonds Way, Edmonds, Wash. 98020;  
**Michael M. Haglund**, 1647 N. 197th Pl., Seattle, Wash. 98133

[21] Appl. No.: 894,270

[22] Filed: Jun. 8, 1992

### Related U.S. Application Data

[63] Continuation-in-part of Ser. No. 565,454, Aug. 10, 1990, Pat. No. 5,215,095.

[51] Int. Cl.<sup>6</sup> ..... A61B 5/00; G01N 21/00

[52] U.S. Cl. .... 128/653.1; 128/654;  
128/664; 128/665; 348/68; 348/77; 348/164;  
364/413.13

[58] Field of Search ..... 128/633, 653.1, 664,  
128/665, 654; 382/6; 358/98, 110, 111, 113;  
364/413.13; 348/65, 162, 164, 68, 69, 77

### [56] References Cited

#### U.S. PATENT DOCUMENTS

4,515,165	5/1985	Carroll	128/664
4,556,057	12/1985	Hiruma et al.	128/634
4,767,717	8/1988	Baisden	128/653.1
4,768,513	9/1988	Suzuki	128/665
4,852,579	8/1989	Gilstad	128/665
4,930,516	6/1990	Alfano et al.	
4,999,614	3/1991	Ueda et al.	358/113
5,014,709	5/1991	Bjelkhagen et al.	128/665
5,027,817	7/1991	John	128/654
5,079,698	1/1992	Grenier et al.	364/413.13
5,119,815	6/1992	Chance	128/665
5,198,977	3/1993	Salb	
5,213,105	5/1993	Gratton et al.	128/665
5,215,095	6/1993	Macvicar et al.	128/665

#### FOREIGN PATENT DOCUMENTS

1026769 7/1983 U.S.S.R. .... 128/653.1

#### OTHER PUBLICATIONS

"Microwave Absorption by Normal and Tumor Cells", *Science*, vol. 174, pp. 72-74.

Herbin et al.; "Automated Registration of Dissimilar

Images: Application to Medical Imagery", pp. 77-88, 1989.

D'Orsi et al., in L. W. Bassett and R. H. Gold eds., *Breast Cancer Detection, Mammography and Other Methods in Breast Imaging*, 2nd ed., Grune & Stratton, Inc., 1987, pp. 169-177.

Grinvald et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115:59, 1991, "High resolution optical imaging of functional grain architecture in the awake monkey".

Ts'o et al., *Science* 249:417, 1990, "Functional Organization of Primate Visual Cortex Revealed by High Resolution Optical Imaging".

Frostig et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6082, 1990; "Cortical functional architecture and local coupling between neural activity and the micro circulation revealed by in vivo high-resolution optical imaging of intrinsic signals".

Primary Examiner—Krista M. Pfaffle

### [57] ABSTRACT

The present invention provides a method for imaging margins, grade and dimensions of solid tumor tissue located in an area of interest, comprising illuminating the area of interest with high intensity, emr (electromagnetic radiation) containing the wavelength of emr absorbed by a dye, obtaining a video signal of the area of interest as an averaged control image and processing the averaged control image into the averaged control frame, administering the dye by bolus injection into a vein circulating to the area of interest, obtaining a series of video images of the area of interest over time as subsequent images and processing each subsequent image as a subsequent frame, comparing each subsequent frame with the processed averaged control frame to obtain a series of difference images, and comparing each difference image for initial evidence of changed absorption within the area of interest which is the outline of solid tumor tissue, whereby tumor tissue is characterized by faster absorption of emr as a result of increased vascularity of solid tumor tissue and inability to clear the dye as fast as normal tissue.

9 Claims, 9 Drawing Sheets

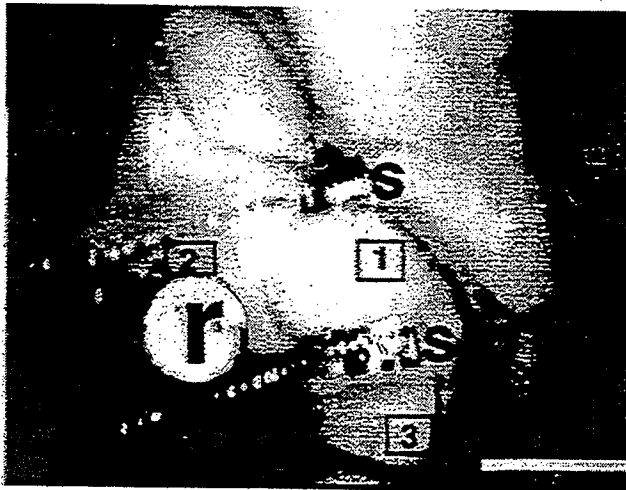


FIGURE 1A1



FIGURE 1A2



FIGURE 1A3



FIGURE 1A4

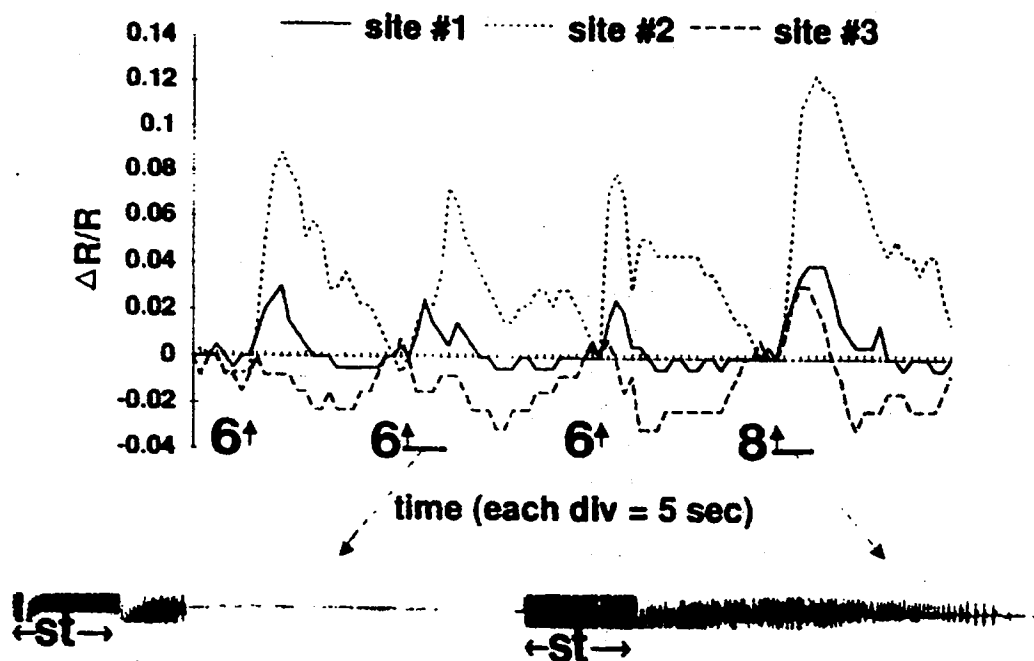


FIGURE 1B

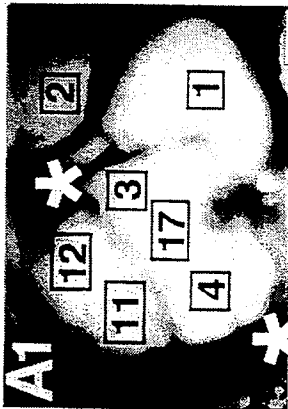


FIGURE 2A1



FIGURE 2A2



FIGURE 2A3

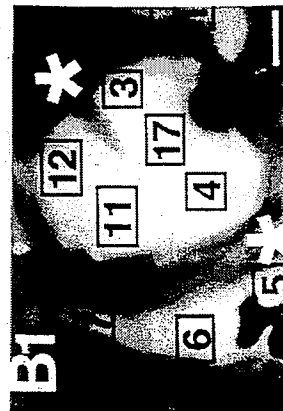


FIGURE 2B1

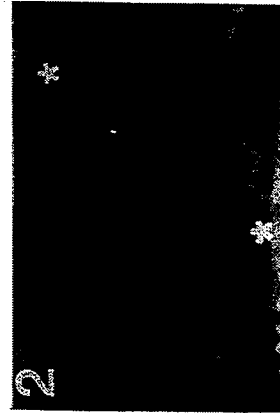


FIGURE 2B2

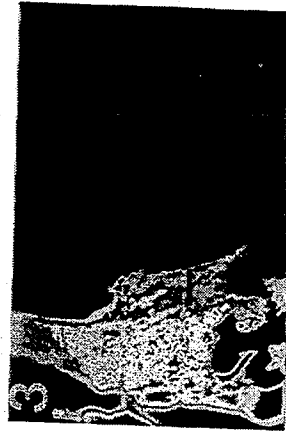


FIGURE 2B3

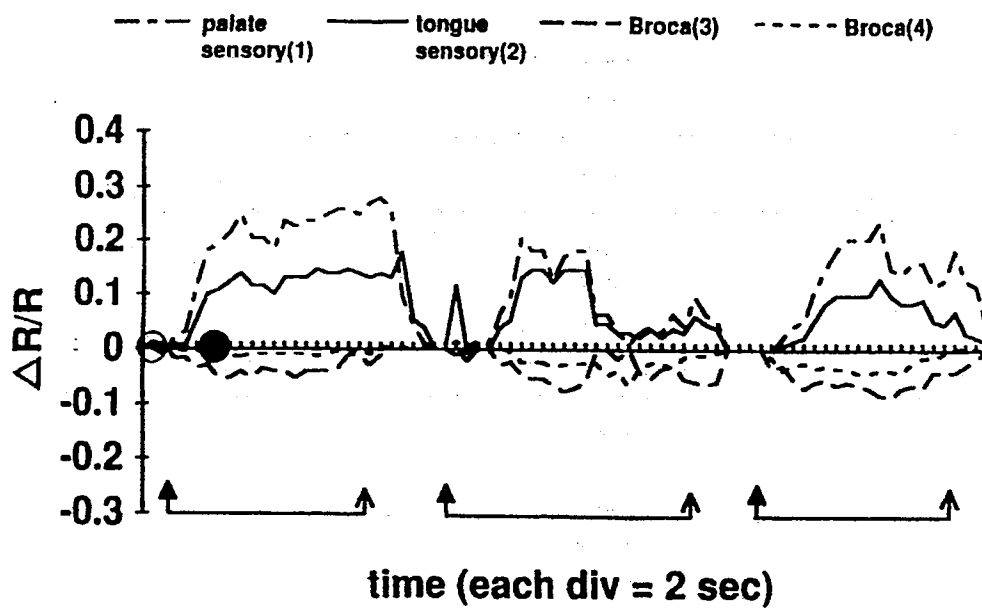


FIGURE 2C

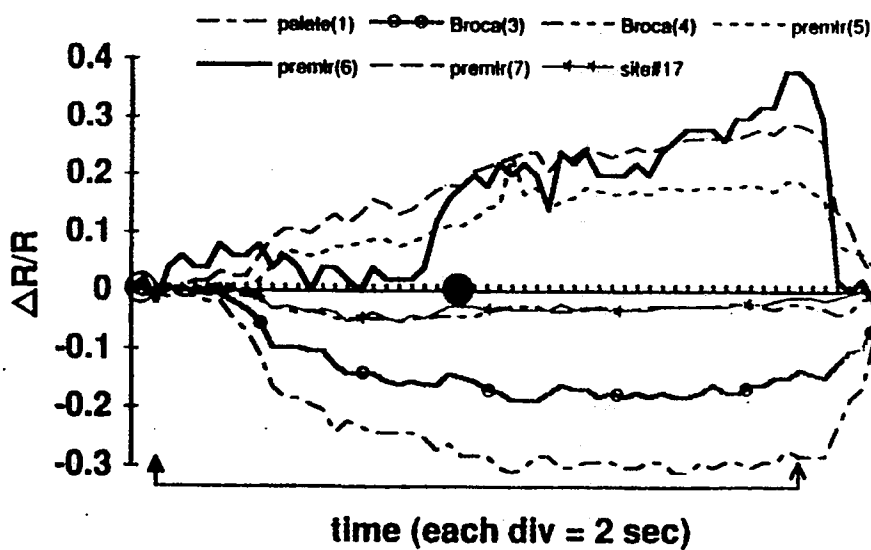


FIGURE 2D

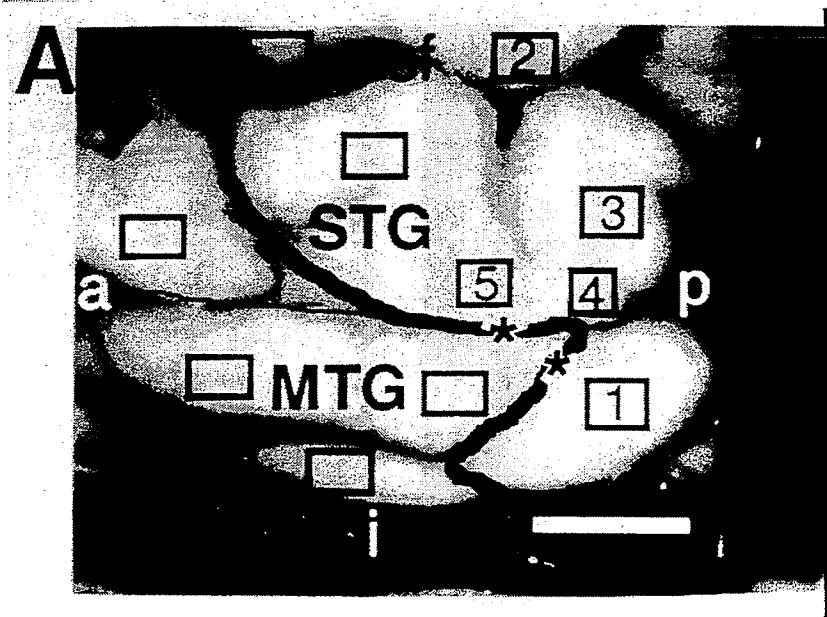


FIGURE 3A

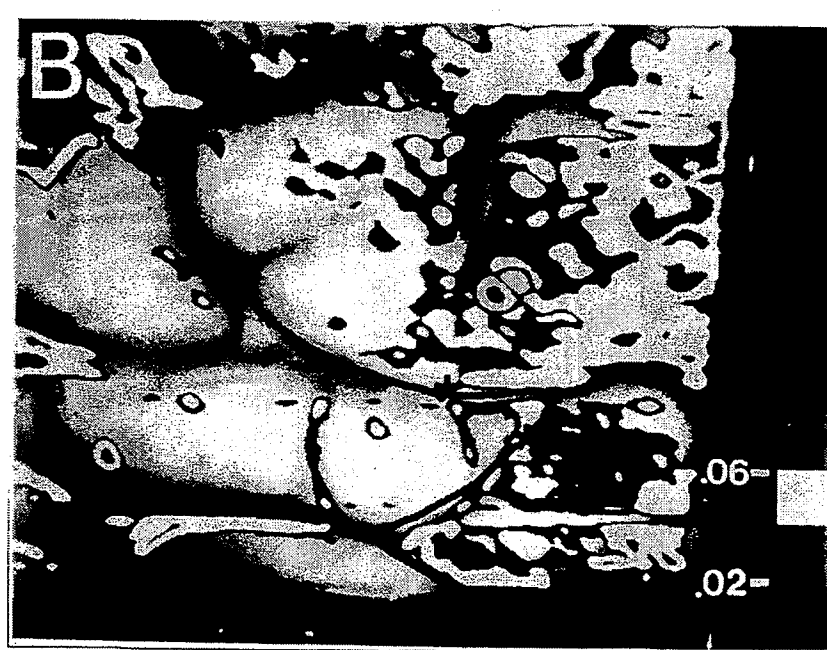


FIGURE 3B

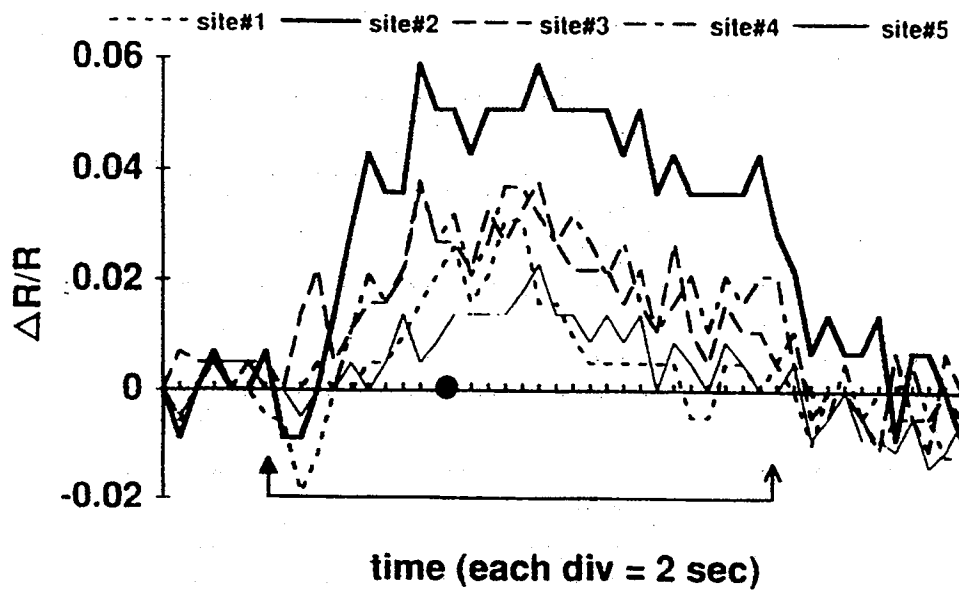


FIGURE 3C

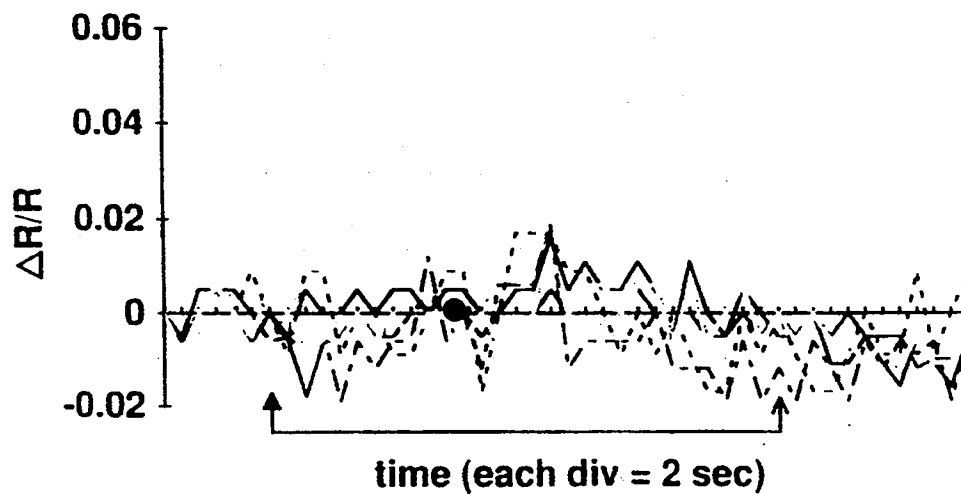


FIGURE 3D

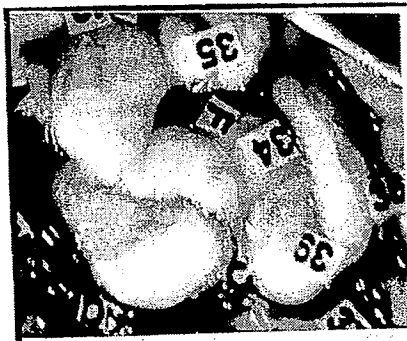


FIGURE 4A

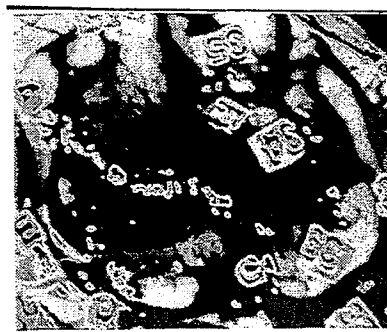


FIGURE 4D

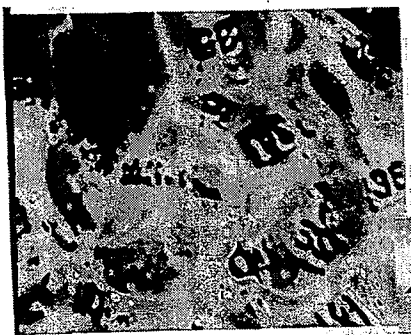


FIGURE 4B

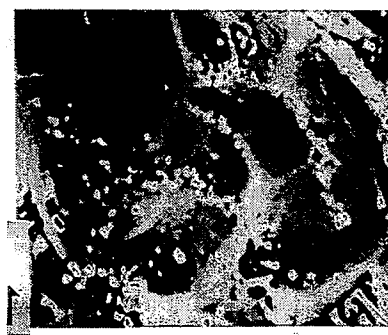


FIGURE 4E



FIGURE 4C

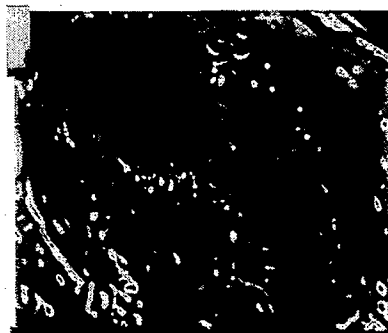


FIGURE 4F





FIGURE 5A

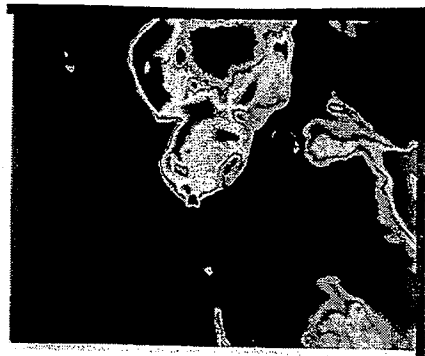


FIGURE 5D



FIGURE 5B

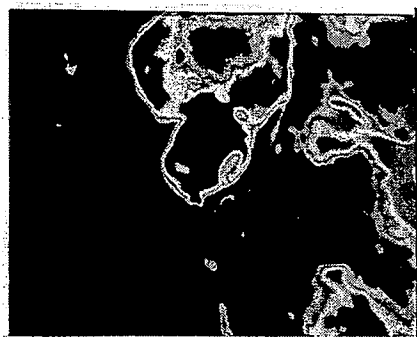


FIGURE 5E

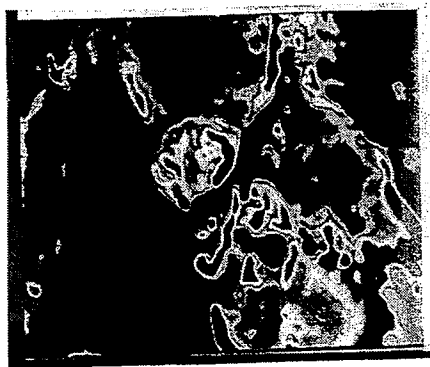


FIGURE 5C



FIGURE 6A

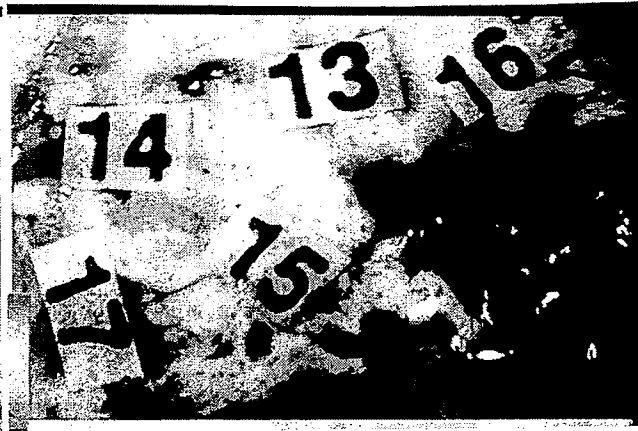


FIGURE 6B

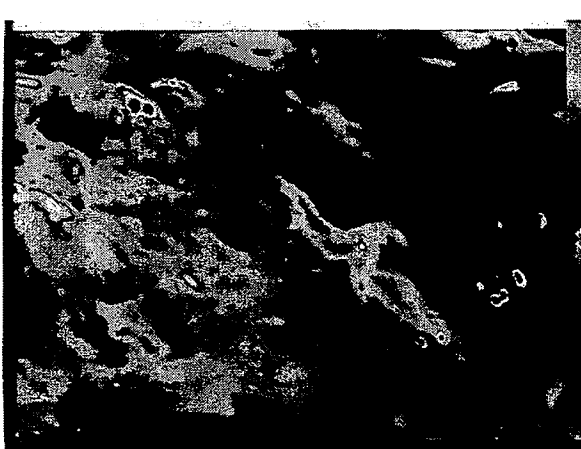


FIGURE 6C

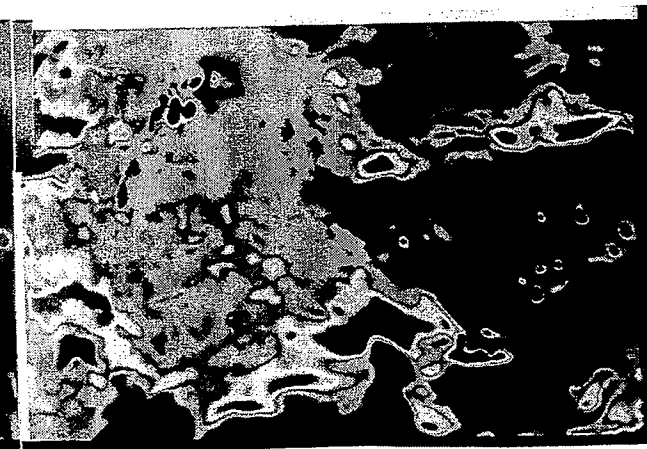


FIGURE 6D

# SOLID TUMOR, CORTICAL FUNCTION, AND NERVE TISSUE IMAGING METHODS AND DEVICE

## CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATION

This application is a continuation-in-part of U.S. patent application No. 07/565,454, filed Aug. 10, 1990, now U.S. Pat. No. 5,215,095.

## TECHNICAL FIELD OF THE INVENTION

The present invention provides a method for real-time detection of solid tumor tissue, plus an ability to grade and characterize tumor tissue. The present invention further provides a method for real-time mapping of functional and dysfunctional cerebral cortex and nervous tissue. The present invention further provides a device for real-time detection and optical imaging for the inventive methods.

## BACKGROUND OF THE INVENTION

A primary goal of neurological surgery is the complete removal of abnormal or pathological tissue while sparing normal areas. Hence, the neurosurgeon attempts to identify boundaries of pathological or dysfunctional tissue and to map adjacent areas of the cortex committed to important functions, such as language, motor and sensory areas so that pathological/dysfunctional tissue is removed without removing functional areas.

Incidence rates for primary intracranial brain tumors are in the range of 50-150 cases per million population or about 18,000 cases per year (Berens et al. 1990). Approximately one half of brain tumors are malignant. The incidence of malignant brain tumors in adults is predominantly in the age range of 40-55 years while the incidence of more benign tumors peaks near 35 years of age. A primary means for treatment of such tumors is surgical removal. Many studies have shown that when more of the total amount of tumor tissue is removed, the better the clinical outcome. For gross total resections of tumors, the 5-year survival rate is doubled when compared to subtotal resection. Both duration of survival and independent status of the patient are prolonged when the extent of resection is maximized in malignant gliomas.

Of the 500,000 patients projected to die of systemic cancer per year in the United States, approximately 25%, or over 125,000 can be expected to have intracranial metastasis. The primary focus for surgery in this group is in those patients with single lesions who do not have widespread or progressive cancer. This group represents about 20-25% of patients with metastases (30,000), however, the actual number of patients that are good candidates for surgery is slightly smaller. Of those patients undergoing surgery, one half will have local recurrence of their tumor at the site of operation, while the other half will develop a tumor elsewhere. The fact that about 50% of the surgeries fail at the site of operation means that an improved ability to remove as much tumor as possible by detecting and localizing tumor margins during tumor removal could potentially decrease the incidence of local recurrence.

Thus, for both primary and metastatic tumors, the more tumor tissue removed, the better the outcome and the longer the survival. Further, by maximizing the

extent of resection, the length of functional, good quality survival is also increased.

Most current tumor imaging techniques are performed before surgery to provide information about tumor location. Presurgery imaging methods include magnetic resonance imaging (MRI) and computerized tomography (CT). In the operating room, only intraoperative ultrasound and stereotaxic systems can provide information about the location of tumors. Ultrasound shows location of the tumor from the surface but does not provide information to the surgeon once surgery begins to prevent destruction of important functional tissue while permitting maximal removal of tumor tissue. Stereotaxic systems coupled with advanced imaging techniques have (at select few hospitals) been able to localize tumor margins based upon the preoperative CT or MRI scans. However studies (Kelly, 1990) have shown that the actual tumor extends 2-3 cm beyond where the image enhanced putative tumor is located on preoperative images. Therefore, the only current reliable method to determine the location of tumors is by sending biopsies during surgery (i.e., multiple histological margin sampling) and waiting for results of microscopic examination of frozen sections. Not only is it not advisable to continually take breaks during surgery, but such biopsies are, at best, an estimation technique and are subject to sampling errors and incorrect readings as compared to permanent tissue sections that are available about one week later. Thus, a surgeon often relies upon an estimation technique as a guide when patient outcome is dependent upon aggressive removal of tumor tissue. Surgeons have difficult decisions between aggressively removing tissue and destroying surrounding functional tissue and may not know the real outcome of their procedure until one week later and this may require an additional surgical procedure.

Multiple histological margin sampling suffers several drawbacks. First this is a time-consuming procedure as it can add about 30 to 90 minutes (depending upon the number of samples taken) to a surgical procedure when the patient is under anesthesia. Second, this procedure is prone to errors as a pathologist must prepare and evaluate samples in short order. Third, it is certainly the case that margin sampling does not truly evaluate all regions surrounding a primary tumor as some areas of residual tumor can be missed due to sampling error. Fourth, increased time for margin sampling is expensive as operating room time costs are high and this leads to increased overall medical costs. Moreover, increased operating room time for the patient increases the probability of infection.

Other techniques developed to improve visual imaging of solid tumor masses during surgery include determining the shape of visible luminescence spectra from normal and cancerous tissue. According to U.S. Pat. No. 4,930,516, in cancerous tissue there is a shift to blue with different luminescent intensity peaks as compared to normal tissue. This method involves exciting tissue with a beam of ultraviolet (UV) light and comparing visible native luminescence emitted from the tissue with a historical control from the same tissue type. Such a procedure is fraught with difficulties because a real time, spatial map of the tumor location is not provided for the use of a surgeon. Moreover, the use of UV light for an excitation wavelength can cause photodynamic changes to normal cells, is dangerous for use in an operating room, and penetrates only superficially into tissue and requires quartz optical components instead of glass.

Therefore, there is a need in the art for a more comprehensive and faster technique and a device for assisting such a technique to localize for solid tumor locations and map precise tumor margins in a real-time mode during surgery. Such a device and method should be further useful for inexpensive evaluation of any solid tumor (e.g., breast mammography) by a noninvasive procedure and capable of grading and characterizing the tumors.

A type of neurosurgical procedure which also exemplifies these principles is the surgical treatment of intractable epilepsy (that is, epilepsy which cannot be controlled with medications). Presently, electroencephalography (EEG) and electrocorticography (ECoG) techniques are used prior to and during surgery for the purposes of identifying areas of abnormal brain activity, such as epileptic foci. These measurements provide a direct measurement of the brain's electrical activity.

Intraoperative EEG techniques involve placing an array of electrodes upon the surface of the cortex. This is done in an attempt to localize abnormal cortical activity of epileptic seizure discharge. Although EEG techniques are of widespread use, hazards and limitations are associated with these techniques. The size of the electrode surface and the distance between electrodes in an EEG array are large with respect to the size of brain cells (e.g., neurons) with epileptic foci. Thus, current techniques provide poor spatial resolution (approximately 1.0 cm) of the areas of abnormal cortical activity. Further, EEG techniques do not provide a map of normal cortical function in response to external stimuli (such as being able to identify a cortical area dedicated to speech, motor or sensory functions by recording electrical activity while the patient speaks). A modification of this technique, called cortical evoked potentials, can provide some functional cortical mapping. However, the cortical evoked potential technique suffers from the same spatial resolution problems as the EEG technique.

The most common method of intraoperative localization of cortical function in epilepsy and tumor surgery is direct electrical stimulation of the cortical surface with a stimulating electrode. Using this technique, the surgeon attempts to evoke either an observed motor response from specific parts of the body, or in the case of an awake patient, to generate specific sensations or cause an interruption in the patient's speech output. Again, this technique suffers from the same problems as the EEG technique because it offers only crude spatial localization of function.

Possible consequences of the inaccuracies of all these techniques, when employed for identifying the portion of the cortex responsible for epileptic seizures in a patient, are either a greater than necessary amount of cortical tissue is removed possibly leaving the patient with a deficit in function, or that not enough tissue is removed leaving the patient uncured by the surgery. Despite these inadequacies, such techniques have been deemed acceptable treatment for intractable epilepsy. The same principles apply to tumor surgeries, however, intraoperative functional mapping is not performed routinely.

In the past few years, researchers have been using imaging techniques in animal models to identify functional areas of cortex with high spatial resolution. One type of such technique uses a voltage-sensitive dye. A voltage-sensitive dye is one whose optical properties change during changes in electrical activity of neuronal

cells. The spatial resolution achieved by these techniques is near the single cell level. Blasdel and Salama (*Nature* 321:579, 1986) used a voltage-sensitive dye (merocyanine oxazolone) to map cortical function in a monkey model. The use of these kinds of dyes would pose too great a risk for use in humans in view of their toxicity. Further, such dyes are bleached by light and must be infused frequently.

Recently, measurement of intrinsic signals have been shown to provide similar spatial resolution as voltage-sensitive dye imaging. Intrinsic signals are light reflecting changes in cortical tissue partially caused by changes in neuronal activity. Unlike other techniques used for imaging neuronal activity, imaging intrinsic signals does not require using dyes (which are often too toxic for clinical use) or radioactive labels. For example, Grinvald et al. (*Nature* 324:361, 1986) measured intrinsic changes in optical properties of cortical tissue by reflection measurements of tissue in response to electrical or metabolic activity. Light of wavelength 500 to 700 nm may also be reflected differently between active and quiescent tissue due, to increased blood flow into regions of higher neuronal activity. Another aspect which may contribute to intrinsic signals is a change in the ratio of oxyhemoglobin to deoxyhemoglobin.

Ts'o et al. (*Science* 249:417, 1990) used a charge-coupled device (CCD) camera to detect intrinsic signals in a monkey model. However, this technique would not be practical in a clinical environment because imaging was achieved by implanting a stainless steel optical chamber in the skull and in order to achieve sufficient signal to noise ratios, Ts'o et al. had to average images over periods of time greater than 30 minutes per image. By comparison to all other known techniques for localizing cortical function, imaging intrinsic signals is a relatively non-invasive technique.

Mechanisms responsible for intrinsic signals are not well understood, possible sources of intrinsic signals include dilatation of small blood vessels, increased scattering of light from neuronal activity-dependent release of potassium, or from swelling of neurons and/or glial cells.

None of the experimental procedures provide a feasible and safe technique for real-time optical functional imaging of cortical activity in a surgical setting to accurately and precisely identify pathological/dysfunctional cortical areas during surgical procedures. Therefore, there is a need in the art for a procedure and apparatus for real-time optical imaging of cortical tissue which can precisely and quickly distinguish normal and abnormal cortical tissue. There is also a need in the art for developing a method that can image intrinsic signals with high spatial resolution, provide immediate images and be compatible with normal procedures in the operating room. This invention was made, in part, in an effort to satisfy this need.

#### SUMMARY OF THE INVENTION

The inventive method and device can be used to identify, grade and characterize solid tumors by imaging changes in electromagnetic absorption which reflects dynamics of dye perfusion through tissue. Further, the inventive method and device can be used to identify areas of neuronal activity during neurosurgical procedures. In particular, this invention can be used by a neurosurgeon intraoperatively to identify areas in the brain dedicated to important functions such as vision, movement, sensation, memory and language. Further

the present inventive method and device can be used to detect areas of abnormal cortical activity, such as epileptic foci. Lastly, the present invention can be used to identify individual nerves during neurosurgical procedures for tumor removal or anastomoses of severed nerves.

The present invention provides an apparatus for imaging tumor tissue or for real-time surgical imaging of cortical intrinsic signals or visualizing margins of solid tumor tissue, comprising, a means for obtaining a series of analog video signals, and a means for processing the analog video signals into either an averaged control image or a subsequent averaged image, a means for acquiring and analyzing a plurality of subsequent images and averaged control images to provide a difference image, wherein the difference image is processed to account for movement and noise and to amplify the changes across a dynamic range of the apparatus, and a means for displaying the difference image alone or superimposed over an analog video image.

The present invention further provides a method for imaging tumor margins and dimensions of solid tumor tissue located in an area of interest, comprising illuminating the area of interest with spatially even, intensive and non fluctuating light containing a wavelength of electromagnetic radiation (emr) (e.g., light) absorbed by a dye, obtaining a video signal of the area of interest as a series of frames and processing the the series of frames into an averaged control image, administering the dye by bolus injection into vasculature circulating to the area of interest, obtaining a subsequent series of frames of the area of interest over time and processing the subsequent series of frames into a subsequent averaged image, comparing each subsequent averaged image with the averaged control image to obtain a series of difference images, and comparing each difference image for initial evidence of changed absorption within the area of interest which is the outline of solid tumor tissue, whereby tumor tissue is characterized by different kinetics of dye uptake compared to normal tissue and a temporally changed pattern of altered absorption of light as a result of increased vascularity of solid tumor tissue. A preferred dye is indocyanine green which has a broad absorption wavelength range and a peak absorption in the range of 730 nm to 840 nm.

The present invention further comprises a method in real-time for optically imaging functional areas of interest of the cortex in a patient comprising illuminating the area of interest with high intensity emr containing near-infrared wavelengths of emr, obtaining a series of frames of the area of interest and processing the series of frames into an averaged control image, administering a stimulus paradigm to the patient to stimulate an intrinsic signal, obtaining a series of subsequent frames of the area of interest over time and processing the subsequent series of frames into a subsequent averaged image, comparing each subsequent averaged image with the averaged control image to obtain a series of difference images, and comparing each difference image for initial evidence of an intrinsic signal within the area of interest, whereby an intrinsic signal is characterized by a change in emr reflectance properties manifest as a signal in the difference image.

The present invention further includes a method for imaging damage to a peripheral or cranial nerves comprising: (a) illuminating an area of interest with high intensity emr, wherein the area of interest comprises the peripheral nerve of interest including the suspected site

of damage and a region adjacent of the suspected site of damage; (b) obtaining a series of frames of the area of interest and processing the series of frames into an averaged control image; (c) Stimulating the peripheral or cranial nerve at a site adjacent of the suspected damaged site; (d) obtaining a series of subsequent frames at the time of stimulation and processing the series of subsequent frames into a subsequent averaged image; and (e) obtaining a difference image by subtracting the averaged control image from the subsequent averaged image to visualize the active region of the peripheral or cranial nerve, whereby nerve blockage is visualized as the point along the nerve where the intrinsic signal from the stimulated nerve abruptly ends, or is altered, attenuated or diminished in the difference image.

The present invention further includes a method for imaging tumor tissue surrounding or adjacent to nerve tissue to aid in selective resection of tumor tissue without destroying nerve tissue, comprising: (a) illuminating an area of interest with high intensity emr containing wavelength of emr absorbed by a dye; (b) obtaining a series of frames of the area of interest and processing the series of frames into an averaged control image; (c) stimulating the nerve; (d) obtaining a series of subsequent nerve frames and processing the subsequent series of nerve frames into a subsequent nerve averaged image; (e) obtaining a nerve difference image by subtracting the nerve averaged control image from the nerve subsequent averaged image to visualize the active nerve; (f) administering a dye into an artery feeding the area of interest; (g) obtaining a series of tumor subsequent frames and processing the tumor subsequent series of frames into a tumor subsequent averaged image; and (h) obtaining a tumor difference image by subtracting the; tumor averaged control image from the tumor subsequent averaged image to create a tumor difference image that is capable of visualizing the tumor. Further, the tumor difference image and the nerve difference image can be superimposed upon each other to simultaneously visualize the relative locations of tumor tissue and nervous tissue.

The present invention further comprises a method for enhancing sensitivity and contrast of the images obtained from tumor tissue or intrinsic signal difference images, comprising: (a) illuminating an area of interest with a plurality of wavelengths of emr, wherein there is at least a first wavelength of emr and a second wavelength of emr; (b) obtaining a sequence of frames corresponding to each wavelength of emr, wherein a first sequence of frames is from the first wavelength of emr, the second sequence of frames is from the second wavelength of emr and so on; (c) processing the first sequence of frames into a first averaged control image, the second sequence of frames into a second averaged control image and so on; (d) stimulating for intrinsic signals or administering a dye for tumor tissue imaging; (e) obtaining a first series of subsequent frames using the first wavelength of emr, a second series of subsequent frames using the second wavelength of emr, and so on, and processing the first, second and so on subsequent series of frames into the first, second and so on subsequent averaged images, respectively; (f) obtaining a first difference image by subtracting the first averaged control image from the first subsequent averaged image and a second difference image by subtracting the second averaged control image from the second subsequent averaged image, and so on; and (g) obtaining an enhanced difference image by ratioing the first difference

image to the second difference image. Preferably, the monochromatic emr sources to illuminate the area of interest are from laser sources. This technique is useful for obtaining three dimensional information of the area of interest.

#### BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

The file of this patent application contains at least one drawing executed in color. Copies of the is patent with color drawings will be provided by the Patent and Trademark Office upon request and payment of the accessory fee.

FIG. 1, A2 illustrates a view of a human cortex just anterior to face-motor cortex with one recording (R) and two stimulating electrodes (s), and three sites (#1, #2, #3) where average percent changes were determined. The scale bar equals 1 cm. Averages of 128 images (4/sec) were acquired at 30 Hz and stored (1/sec). After acquiring 3-6 averaged control images (5 sec/image), a bipolar cortical stimulation evoked epileptiform afterdischarge activity.

FIG. 1, A2 shows the percentage difference image representing baseline activity between two controls before stimulation.

FIG. 1, A3 represents an image (4 sec average, 128 frames) obtained immediately after stimulation (4 sec, 6 mA). This stimulation was followed by the shortest of the four afterdischarge episodes (bottom left trace of FIG. 1B). The black cortical areas surrounding the cator areas represent regions where the optical changes are below baseline.

FIG. 1, A4 represents an image (4 sec average, 128 frames) obtained immediately after stimulation #4 (4 sec, 8 mA). This stimulation elicited the longest of the four afterdischarge episodes (bottom right trace of FIG. 1B).

FIG. 2 shows anterior-left, posterior-right, superior-top, and Sylvan fissure-bottom images of a human brain. Asterisks on the cortical surface serve as reference points between 2A1 and 2B1. The scale bar is again equal to 1 cm. In A 1, the numbered boxes represent sites where cortical stimulation evoked palate tingling (1), tongue tingling (2), speech arrest-Broca's areas (3,4) and no response (11, 12, 17). During three trials, an image was averaged (1 sec, 32 frames) and stored (1 sec) every 2 sec at rest, during 40 sec of tongue movement, and during recovery. The closed arrowhead shows when tongue movement began and open arrowheads when the movement stopped.

In FIG. 2, A2 a percentage difference image was taken from two cortical images before tongue movement. Open circle on the time line in FIG. 2C shows the times at which the averaged control images were taken. The image shows some noise about the baseline at rest. The magnitude of optical change for all images of FIG. 2 is represented by the pseudocolor scale.

FIG. 2, A3 shows the percentage difference image during tongue movement. The filled circle on time line FIG. 2C shows when this image was taken.

FIG. 2, B1 shows the cortical surface from the same patient as is shown in all images of FIG. 2 with the image moved anteriorly to incorporate more of the premotor cortex (asterisks at the same sites in A1-2 and B1-2). In other premotor sites (#5, #6, #7), no change in language was found during cortical stimulation. The patient viewed blank slides (control) and then named slides of objects which were presented every 2 seconds (2B2, 2B3). The percentage difference images during

naming comparing control image (2B2) to the optical changes during naming (2B3) are shown. Circles on the time line (2D) represent when the control image (B2, open circle) and naming image (B3, closed circle) were obtained. The maximum optical changes during naming are in the premotor region and not in the area activated by tongue movement without speech.

FIG. 2C shows the average percentage difference change from each of four areas with positive responses to cortical stimulation mapping. The changes in the four areas were repeatable and the largest change in the positive direction was from the palate sensory cortex (site #1). FIG. 2D shows the percentage difference changes from sites labeled in FIG. 2B1 and shows significant increases in the premotor cortex (sites #5, #6, and #7). Significant optical changes in the opposite direction occurred in the sensory cortex (site #1) and at site #3. The premotor region also showed temporal differences in activation., with the center area (site #6) increasing first and the regions above site #7 and below site #5 increasing later.

FIG. 3A shows an image of a cortical surface from a patient labeled for anterior (a), Sylvan fissure (sf), superior temporal gyrus (STG) and middle temporal gyrus (MTG). After the optical imaging, all cortical tissue to the left of the thick line was surgically removed. Sites #1 and #2 were identified as essential for speech (e.g., cortical stimulation blocked ability of subject to name objects). At site #3, one naming error in 3 stimulation trials was found. As the surgical removal reached the area labeled by the asterisks on the thick line, the patient's language deteriorated. All other unlabeled sites (FIG. 3A) had no errors while naming slides during cortical stimulation.

FIG. 3B shows an overlay of a difference image on the cortical analog image showing optical changes during naming (filled circle in FIG. 3C shows when image was collected). The magnitude of optical change is represented on the pseudocolor scale. The majority of the optical changes were in the region of essential and secondary language sites, but not in the more anterior cortex. Anteriorly, the optical changes were restricted to blood vessels.

The average percentage changes from two sites considered essential for language (sites #1 and #2) and secondary sites (#3, #4, and #5) are shown in FIG. 3C. All five sites show optical changes compared to six more anterior sites that were not critical for language function. FIG. 3D shows the average percentage changes from the six unlabeled boxes in FIG. 3A. There were no significant increases or decreases at these more anterior sites.

FIG. 4 shows a series of images from a patient having a low grade CNS tumor (astrocytoma, grade I). In FIG. 4A (upper left) the letters overlay the tumor as found by ultrasound, however tumors of this type and grade are notoriously difficult to distinguish from normal tissue once removal of the tumor begins. FIG. 4B (middle left) shows a difference image taken about 15 sec after dye administration (indocyanine green 1 ug/kg). FIG. 4C (lower left) shows the difference image about 30 sec after dye administration. The area of tumor tissue shows the first tissue staining. In this low grade tumor, all tissue (normal and abnormal) shows staining at 45 sec after dye administration as shown in FIG. 4D. FIG. 1E (middle right) is one minute after dye administration and FIG. 4F (lower right) is five minutes after dye administration showing complete dye clearance in this

low grade tumor. These data show that tumor tissue takes up dye faster. Therefore, it is possible to image even low grade tumors by the inventive apparatus.

FIG. 5 shows a series of images from the cortex of a patient with a malignant CNS tumor (glioblastoma; astrocytoma, Grade IV). FIG. 5A (upper left) shows the visual image of this malignant brain tumor which was most malignant in the center and to the right (as was shown by pathology slides available one week after surgery) but was not malignant to the left. FIG. 5B (middle left) is the difference image at 15 sec after dye injection showing tissue looking like a low grade tumor surrounded by normal tissue. However at 30 sec (FIG. 5C, lower left), the normal tissue to the left is slightly more visible but malignant tissue is even more intense. After one minute (FIG. 5D, upper right) the initial intense staining in tumor tissue is maintained, and even remains at 10 minutes after dye in FIG. 5E (lower right). Therefore, it is possible to not only image the location of tumor tissue, but to also grade the tumor with more malignant tumors retaining dye for a longer period of time than a lower grade tumor.

FIG. 6 is a series of images and difference images of an area of interest where a tumor was resected and biopsies were taken for multiple histological margin sampling. The area of interest was thought to be free of tumor during the procedure. Normally, in this size of a resection margin, only a single frozen sample would be taken for pathology analysis. In this case, while the surgeon was waiting for a pathology report based upon frozen sections (standard procedure), the images shown in FIG. 6 were obtained. FIG. 6A (upper left) is an analog image of the area of interest and FIG. 6B (upper right) shows the area of interest with histological markers. FIG. 6C (lower left) shows the post dye difference image taken at one minute and at 10 minutes (FIG. 6D, lower right). Both post dye difference images show a number of positive sites. This procedure is described in Example 4.

#### DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention provides an apparatus for imaging neuronal intrinsic signals in real time and for determining the presence, size, margins, dimensions, and grade of a solid tumor mass using a dye. The present invention further provides a method for functional mapping of the cortex in a patient by mapping intrinsic signals in real time, a method for determining the presence, size, location, and grade of solid tumor tissue in real time without the sampling errors of biopsies or the delay of and possible misdiagnosis of the pathologist's frozen section analysis, and a method for imaging nerve tissue that may be physically damaged or surrounded by and adjacent to tumor cells. The inventive methods employ a similar apparatus, comprising a series of components, including video input hardware and dedicated image processing hardware. The video input hardware is, for example, a photo-detector, such as a CCD (charge coupled device) camera (preferably a COHU 6510 CCD Monochrome Camera with a COHU 6500 electronic control box made by COHU Electronics San Diego, Calif.). In some cameras the analog signal is digitized 8-bits deep on an ADI board (analog-to-digital board). The dedicated image processing hardware is generally a "host computer". The host computer is any common general computer (such as an IBM PC type or Sun SPARC) that is interfaced with imaging hardware

and sends commands to the imaging hardware that direct data flow, computations, image acquisition and the like. Thus, the host computer directs the actions of the imaging hardware and provides the user interface.

#### Definitions

The following are definitions of commonly used terms and that are applied in this application according to their art-accepted usage, such as described in Inoue, *Video Microscopy* Plenum Press, New York, 1989.

Area of Interest is that area of tissue that comprises the subject of the image.

Arithmetic Logic Unit (ALU) is the hardware component that performs a variety of mathematical and logic operations (e.g., sum, difference, exclusive or, multiply by a constant, etc.) on the image signal at extremely high speeds.

Averaged Control Image is that updateable image that is the average of a series of real time images over a period of time.

Charge Coupled Device (CCD) is a photo-sensitive silicon chip used in place of a pickup tube in miniature video cameras.

Difference Image is the manipulated image created by adding or subtracting a subsequent image or a particular image in time from an averaged control image.

Frame is a single digitized array of single video pictures.

Frame Buffer is a piece of hardware that serves as a temporary storage of a frame, such as an averaged control image, a subsequent image or a difference image.

Geometric Transformation (Gonzalez and Wintz, *Digital Image Processing*, Addison-Wesley Publishing Co., Reading, 1987) generally modify spatial relationships between pixels in an image. For this reason, geometric transformations are often called "rubber sheet transformations" because they can be viewed as the process of "printing" an image on a sheet of rubber and stretching this sheet according to a predefined set of rules. As applied to video imaging, subsequent images can be viewed as having been distorted due to movement and it is desirable to "warp" these images so that they are similar to the control images. Geometric transformations are distinguished from "point transformations" in that point transformations modify a pixel's value in an image based solely upon that pixel's value and/or location and no other pixel values are involved in the transformation.

Image is a frame or composition of frames that have been altered after digitization, such as processing a sequence of frames into an averaged control image or a subsequent averaged image.

Intrinsic Signal means a detectable change in reflectance properties of neuronal tissue due to endogenous physiologic activity. Possible causes of intrinsic signals include, for example, membrane depolarization; glial cell swelling, ion flux across neuronal membranes, blood volume changes, blood oxygenation (hemoglobin to oxyhemoglobin), tissue oxygenation and combinations thereof.

Linear Histogram Stretch is a transformation in which the values between two points (high, low) are reappeal to cover a full range of values (i.e., dynamic range). For example, the low value is mapped to zero, the high to 255, and the intermediate values are mapped to linearly increasing brightness values. All brightness values below the low value are set to zero and all



brightness values above the high value are set to the high value.

Look Up Table (LUT) is a piece of hardware that functions to store memory that directs conversion of the gray value of each pixel into another gray value or color that is specified by the LUT. The LUT can be programmed to manipulate image contrast, threshold an image, apply pseudocolor and the like (such as a convenient implementation method for point processing algorithms). In the case of the present invention, the LUTs are, preferably, implemented for speed on an ADI and/or ALU boards.

Paradigms cause a change in electrical activity of an area of cortical tissue dedicated to a specific function (e.g., speech, language, vision, etc.) thus causing an increase or decrease in what is called an intrinsic signal.

Pixel is the individual units of image in each frame of the digitized signal. The intensity of each pixel is linearly proportional to the intensity of illumination before signal manipulation and corresponds to the amount of emr (photons) being reflected from a particular area of tissue corresponding to a particular pixel. It should be noted that an image pixel is the smallest unit of a digital image and its output intensity can be any value. A CCD pixel is the smallest detecting element on a CCD chip and its analog output is linearly proportional to the number of photons it has detected.

Processed Difference Image is the raw difference image that has been processed or manipulated to filter out noise or movement and increase the dynamics of effect of different pixel values to illustrate events in the area of interest.

Tumor Margin is the area where the surgeon has resected the tumor.

#### Apparatus

The inventive apparatus is made as one unit or a group of components. The first component is a high intensity emr source. The emr source is for illuminating the cortical surface or area of interest, such as an area suspected of having solid tumor tissue. Different intrinsic signals can be illuminated by different wavelengths of emr. Moreover, the emr source must include the wavelengths of emr absorbed by the dye for the tumor imaging method. For example, when the dye is indocyanine green, preferred wavelengths are from about 730 nm to about 840 nm. For other dyes, the preferred wavelengths of illuminating emr should include wavelengths at which the dye absorbs. The term emr instead of light is used because it is also possible to image in the infrared region of the spectrum outside of the visible light range.

When determining intrinsic signals from the cortex, reflected emr can be filtered to allow for video imaging of only selected wavelengths of emr. Preferred selected wavelengths of emr include, for example, from about 500 nm to about 900 nm, or most preferably, the near infrared spectrum. Generally, longer wavelengths (e.g., approximately 800 nm) measure deeper cortical activity.

Moreover, that part of the infrared spectrum in an invisible range of between 0.75 to about 1000 micrometers allows for a determination of intrinsic signals through dura and skull, thereby allowing for a determination of intrinsic signals through intact skull and dura and without the risks associated with neurosurgery. When using this range of far infrared wavelengths, an IR detector is a different device than a CCD chip for a

visible analog camera. IR detectors are made from materials such as indium arsenide, germanium and mercury cadmium telluride rather than silicon. IR detectors must be cryogenically cooled in order that they be sensitive to small changes in temperature. For example, one IR imaging system is an IRC-64 infrared camera (Cincinnati Electronics, Mason Ohio).

As heat reaches the surface of the cortex, it emits electromagnetic radiation in the range of about 3-5 or 8-14 microns. Others have attempted to image this emitted radiation (see, for example, Gorbach et al., "Infrared Mapping of the Cerebral Cortex" *Thermography* 3:108, 1989). However, according to the present invention these emitted wavelengths are filtered out and an IR detector instead of a CCD detector is used. An IR emr source is, for example, a Tunable IR Diode Laser from Laser Photonics, Orlando, Fla. The imaged wavelengths are different from body heat and images of changes in absorption and emr scattering can be obtained according to the inventive method. In the case of tumor images through intact skin and possibly bone, a dye that absorbs in the IR can be used (e.g., indocyanine green). Other useful dyes include, for example, Photofrin® derived from a hematoporphyrin derivative (HPD) and absorbs light at 630 nm, mono espatyl chlorin-36 (NPe<sub>6</sub>, Nippon Petrochemical, Japan), benzoporphyrin derivative (BPD, Quadra Logic Vancouver BC), and combinations thereof.

Preferably, the emr source, is a high intensity, broad spectrum emr source, such as a tungsten-halogen lamp and a cutoff filter for all wavelengths below 695 nm. Most preferably, the emr source is directed to the area of interest by a fiber optic means. An example of such a emr source is a fiber optic emr passing through a beam splitter, controlled by a D.C. regulated power supply (Lambda, Inc.) and passed through a 695 nm longpass filter.

The inventive apparatus includes a means for obtaining an analog video signal of the cortex or area of interest. A preferred device for obtaining an analog video signal is a charge coupled device (CCD) video camera which creates an output video signal at 30 Hz having, for example, 512 horizontal lines per frame using standard RS 170 convention. One such device is a CCD-72 Solid State Camera (Dage-MTI Inc., Michigan City Ind.) and another such device is a COHU 6500 (COHU, San Diego Calif.).

The area of interest must be evenly illuminated to better adjust the signal over a full dynamic range. If there is uneven illumination in the area of interest, it will limit the dynamic range. Preferably a high intensity and diffuse or even lighting system is used. Techniques to obtain even illumination over the area of interest include, for example, diffuse lighting, image processing algorithms to compensate for uneven illumination on a digitized image, a constant shade gray image marker point in the area of interest as a control point, a wavelength cutoff filter in front of the camera and/or emr source, or combinations thereof. Preferably, a regulated power supply will prevent fluctuations in emr sources. A footplate system is an optical glass (sterile) contacting and covering the area of interest to provide a flatter contour. The footplate also retards tissue movement.

The analog signal must first be adjusted to maximize sensitivity of detection (at the level of the analog signal and before digitizing) to amplify the signal and spread the signal across the full possible dynamic range, thereby increasing sensitivity of the apparatus. 60 Hz



noise (such as from A.C. power lines) is filtered out in the camera control box by an analog filter. Such adjustments further serve to enhance, amplify and condition the analog signal from the CCD. One means for properly adjusting the input analog signal is to digitize this signal at video speed (30 Hz), and view the area of interest as a digitized image that is converted back to analog.

It is important to compensate for small movements of tissue or the patient during the imaging process. Larger patient-movements require a new orientation of the camera and obtaining a new averaged control image. Compensating for movement can be done by mechanical or computational means or both. Mechanical means include, for example, placing a footplate over the area of interest wherein the footplate comprises sterilized optical quality glass in a framing device, and/or securing the camera and possibly the emr source to the skeletal frame of the patient, and combinations of both. When the camera and/or emr source are attached to the skeletal structure of the patient, any patient movements will not effect the image because the camera and illumination source will remain in a constant orientation to the area of interest. The advantage of the footplate is that it retards tissue movement caused by arterial pressure and/or respiration and prevents changes due to evaporation of cerebrospinal fluid. Computational means include, for example, using functional control points in the area of interest and triangulation-type algorithms to compensate for movements of these control or tie points, and "image warping" techniques whereby each subsequent image is registered geometrically to the averaged control image to compensate for movement, and combinations of both techniques. The image warping technique is described in, for example, Wolberg, "Digital Image Warping" IEEE Computer Society Press, Los Alimitos, Calif. 1990. The image warping technique can further indicate when movement has become too great for the averaged control image and that a new averaged control image must be taken. Control points can be placed directly in the area of interest, such as directly on the cortical surface for intrinsic signal analysis. For example, Goshtasby ("Piecewise Linear Mapping Functions for Image Registration" in *Pattern Recognition* vol. 19 pp 459-66, 1986) describes a method whereby an image is divided into triangular regions using control points. A separate geometrical transformation is applied to each triangular region to spatially register each control point to a corresponding triangular region in a control image.

The analog video signal is continuously fed into a means for processing the signal. One such means for acquiring and analyzing data is an image analyzer (e.g., Series 151 Image Processor, Imaging Technologies, Inc. Woburn Mass.). An image analyzer can receive and digitize an analog video signal with an analog to digital interface and perform such a function at a frame speed of about 1/30th of a second (e.g., 30 Hz or "video speed"). Processing the signal involves first digitizing the signal into a series of pixels or small squares assigned a value (in a binary system) dependent upon the number of photons (i.e., quantity of emr) being reflected off tissue from the part of the area of interest assigned to that pixel. For example, in a standard  $512 \times 512$  image from a current technology CCD, there would be 262,144 pixels per image. In an 8 bit system, each pixel is represented by 8 bits. One can cool the CCD to reduce thermal noise.

Preferably, the signal processing means includes a programmable look-up table (e.g., CMI50-LUT16, Imaging Technology, Woburn Mass.) initialized with values for converting gray coded pixel values, representative of a black and white image, to color coded values based upon the intensity of each gray coded value. This provides image enhancement via an image stretch. An image stretch is a technique whereby the highest and lowest pixel intensity values used to represent each of the pixels in a digital image frame are determined over a region of the image frame which is to be stretched. Stretching a selected region over a larger range of values permits, for example, easier identification and removal of relatively high, spurious values due to noise (e.g., glare).

Each image received is stored in the frame buffer, preferably within the context of a CPU as a frame of data elements represented, for example, as a 512 by 512 array of pixels. Each pixel has a 8 bit value corresponding to one of 256 levels of gray.

The processing means further includes a plurality of frame buffers having frame storage areas for storing frames of digitized image data received from the A/D interface. The frame storage area comprises at least one megabyte of memory space, and preferably at least 8 megabytes of storage space. An additional 16-bit frame storage area is preferred as an accumulator for storing processed image frames having pixel intensities represented by more than 8-bits. The frame buffers are temporary fast memory. The processing means should include at least three frame buffers. One is for storing the averaged control image, another is for storing the subsequent image and a third is for storing a difference image between the averaged control image and the subsequent image.

The processing means further includes an arithmetic logic unit (ALU) (e.g., ALU-150 Pipeline Processor) for performing arithmetical (add, subtract, etc.) and logical (and, or, etc.) functions from data located in one or more frame buffers. An ALU is a fast processor. The ALU allows for image averaging in real time. For example, a newly incoming digitized image can be sent directly to the ALU and is added or subtracted to an averaged control image sitting in a frame buffer by passing both images through an ALU and adding them. After a last image is added, this 16 bit result can be sent again through an ALU which will divide this result by a constant (i.e., the total number of images). The output from the ALU is either stored in a frame buffer, sent for more processing, or used as its own input and again combined with another image.

It is important to compensate for patient movement in the digitized images before subtracting such images. Thus, geometric transformations are applied to the images so that they are geometrically registered prior to subtraction.

The inventive apparatus can enhance processing speed to create a difference frame by adding a real time modular processor or faster CPU chip to the image processor. For example, one real time modular processor is a 150 RTMP-150 Real Time Modular Processor (Imaging Technology, Woburn Mass.).

The processing means further may include a means for performing a histogram stretch of the difference frames (e.g., Histogram/Feature Extractor HF 151-I-V module, Imaging Technology, Woburn Mass.) to enhance each difference image across its dynamic range. A linear histogram stretch is described in, for example,